# 台灣農業研究

# JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.67 No.3 2018

## Research Articles

229 Molecular and Serological Identification of *Gloriosa stripe mosaic virus* on Christmas Bells (*Sandersonia aurantiaca* Hook)
*Chin-Chih Chen, Fen-Lang Chiang, and Chun-Huey Huang*

247 Effects of Colchicine Treatments on Polyploidy Induction Using Protocorms of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*
*Chin-Yi Tsao, Uei-Chern Chen, Rung-Yi Wu, Tzu-Ying Wu, and Chi-Ni Hsia*

258 Growth Evaluation on Different Vegetable Species Grown in a Photovoltaic Greenhouse with 40% Coverage of Solar Panel on the Roof
*Hsiang-I Lee, Shough-Peng Lee, Miao-Miao Hsu, and Hui-Ling Lo*

270 Phylogenetic Analysis and Grouping Detection of Species *Shallot latent virus* by Nested-PCR
*Mei-Ju Lin, Yi-Ting Lin, Chin-Hui Tsai, and Ting-Chin Deng*

283 Evaluating the Effectiveness of Methyl Salicylate on Attracting Predators
*Yaw-Jen Dong and Bei-Chen Hsiu*

292 Influence of Storage Conditions of *Camellia brevistyla* Seeds on the Quality of Pressed Oils
*Ching-Ming Hsieh, Jeng-Chuann Yang, Huu-Sheng Lur, Yao-Chun Chuang, Kuang-Ping Hsu, and Ya-Lin Lee*

## Short Communications

301 Immunogenicity of Tobamovirus Universal Antibodies Raised Against Expressed Protein Encoded by a Synthetic Polynucleotide Containing Epitope Genes of ToMV, ORSV, and CGMMV
*Chien-Ming Chou, Chun-Tao Chen, Chin-Hui Tsai, Chin-Chih Chen, and Ting-Chin Deng*

309 Regulating the Harvest Period of Water Bamboo by Use of Night-time Lighting and Shoots Cut-off
*Jin-Hsing Huang, Jiunn-Feng Su, and Po-Sung Chen*

318 Basal Stem Rot of Betel Palm Caused by *Ganoderma boninense* in Taiwan
*Jyh-Nong Tsai, Pao-Jen Ann, Chu-Ping Lin, and Hui-Ling Tsai*

ISSN 0022-4847
9 770022 484003

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.67 No.3 2018

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.67 No.3 2018

## 研究報告

229 宮燈百合*Gloriosa stripe mosaic virus*之核酸分子和免疫法鑑定
陳金枝、江芬蘭、黃春惠

247 秋水仙素處理對藍紫色蝴蝶蘭*Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*原球體多倍體誘導之影響
曹進義、陳威臣、吳容儀、吳姿穎、夏奇鈮

258 營農型光電溫室環境對多種葉菜類蔬菜生長之影響
李香誼、李碩朋、許淼淼、羅惠齡

270 分蔥潛隱病毒親緣分析及應用巢式聚合酶鏈鎖反應作分群偵測
林玫珠、林羿廷、蔡錦慧、鄧汀欽

283 評估水楊酸甲酯對捕食性天敵的誘引效果
董耀仁、許北辰

292 油茶籽儲藏條件對壓榨油品質之影響
謝靜敏、楊正釧、盧虎生、莊曜駿、徐光平、李雅琳

## 研究簡報

301 以含ToMV、ORSV及CGMMV表位基因的合成聚核苷酸所表現的蛋白製備Tobamovirus廣效性抗體的抗原性
周建銘、陳君弢、蔡錦慧、陳金枝、鄧汀欽

309 利用夜間照光與割除枝葉以調控茭白筍採收期
黃晉興、蘇俊峰、陳泊菘

318 靈芝引起的檳榔基腐病
蔡志濃、安寶貞、林筑蘋、蔡惠玲

行政院農業委員會農業試驗所出版

# 《台灣農業研究》編審會

**總編輯**

楊純明／農業試驗所作物組

**領域主編 (按筆劃序)**

王強生／國立中興大學農藝學系
王淑珍／國立台灣大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
吳文哲／國立台灣大學昆蟲學系
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
沈偉強／國立台灣大學植物病理與微生物學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
柯俊成／國立台灣大學昆蟲學系
高景輝／國立台灣大學農藝學系
張永和／靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業試驗所植物病理組
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳宗禮／國立中興大學農藝學系
陳郁蕙／國立台灣大學農業經濟學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
曾夢蛟／國立中興大學園藝學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／國立台灣大學園藝暨景觀學系
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
簡立賢／國立中興大學應用經濟學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

**編輯助理**

吳惠卿／農業試驗所技術服務組
王紫瑜／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

**編輯助理顧問**

吳宜晏／農業試驗所技術服務組



# 台灣農業研究

第六十七卷　第三期　　中華民國一〇七年九月三十日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　陳駿季
總編輯　楊純明
地址　41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　http://www.ipress.tw/J0042

編印　Airiti Press
地址　23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店／ 10485 台北市松江路 209 號 1 樓／電話 : (02) 2518-0207
國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場／ 40042 台中市中山路 6 號／電話 : (04) 2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(3):229–246 (2018)
DOI:10.6156/JTAR.201809_67(3).0001

研究報告

# 宮燈百合 *Gloriosa stripe mosaic virus* 之核酸分子和免疫法鑑定

陳金枝 [1,*]　江芬蘭 [2]　黃春惠 [2]

## 摘要

陳金枝、江芬蘭、黃春惠。2018。宮燈百合 *Gloriosa stripe mosaic virus* 之核酸分子和免疫法鑑定。台灣農業研究 67(3):229–246。

本研究於進口宮燈百合 (*Sandersonia aurantiaca* Hook) 檢測出一種 *Potyvirus* 屬病毒，經鞘蛋白 (coat protein; CP) 核酸序列分析，確認其乃屬於嘉蘭條斑嵌紋病毒 (*Gloriosa stripe mosaic virus*; GSMV) 成員，分離株代號 CB。CB 分離株以反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 法由其核酸 3' 端之 polyA 起始，往 5' 端以不同引子對分段增幅，進而選殖其核酸片段進行定序，共解得 9,455 個核苷酸，其內包含對應全長度大蛋白之 9,156 個核苷酸 (對應 3,052 個胺基酸)，相關序列已登錄於 GenBank 並取得登錄序號為 EF427894。對應 CB 分離株之 CP 有 798 個核苷酸，可轉譯出 266 個胺基酸。本研究由宮燈百合和火焰百合 (即嘉蘭) (*Gloriosa* spp.) 另分別定序得到 5 個 GSMV 分離株的 CP 核苷酸序列，並均登錄於 GenBank 取得序號，包括來自宮燈百合的 CB4 (KT764122) 和 CB18 (KT764123)；來自火焰百合的 GL2 (KT764120)、GL3 (KT764124) 和 GL4 (KT764121)。所有分離株與國外已登錄之火焰百合 GSMV 分離株 (EU042761) 間，CP 胺基酸序列相同度介於 86.5–94.0%，均屬於 GSMV 成員。而由類緣關係顯示，來自 3 個宮燈百合 GSMV 分離株間有較相近的分群。依據 CB-CP 核苷酸序列設計 3 組引子對 (上游引子分別為 GSMV715u、GSMV660u 及 GSMV500u，搭配共同下游引子 GSMVd)，以 GSMV660u/GSMVd 及 GSMV500u/GSMVd 兩組引子對，於 RT-PCR 法中均可檢測出宮燈百合和火焰百合上之 GSMV；而 GSMV715u/GSMVd 僅可檢測到宮燈百合 GSMV，對感染火焰百合之 GSMV 則無預期片段被增幅出，此引子對可應用於宮燈百合 GSMV 之鑑別性檢測。將 CB-CP 全長度核苷酸選殖於表現載體 pET28b 上，轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) 宿主內誘導表現蛋白之生成，將預估分子量約 31.6 kDa 之細菌表現蛋白純化後，經兔免疫注射而獲得對應 CB-CP 之多元抗體。於 indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 和西方墨點法中，此 CB 多元抗體可與同源抗原 (CB-CP 表現蛋白) 產生反應，也可成功檢出宮燈百合和火焰百合之 GSMV 罹病組織。GSMV 為文獻上發生於火焰百合之病毒記錄，但於宮燈百合上為首次發現，本研究並為首度完成 GSMV 全長度核酸定序者。本研究所製備之 GSMV 引子對及多元抗體，均已應用於進口宮燈百合種球之病毒監測，可提升我國對 GSMV 之自主檢測能力。

**關鍵詞**：宮燈百合、嘉蘭條斑嵌紋病毒、全長度核酸序列、RT-PCR 檢測、多元抗體。

## 前言

宮燈百合 (*Sandersonia aurantiaca* Hook) 別名宮燈花、中國燈籠、聖誕百合，英文名稱為 Christmas bells。原產於南非，而紐西蘭為其主要的商業化栽培國；宮燈百合為台灣新興之球根花卉，種球主要由紐西蘭進口，目前於台灣之清境、埔里和后里有零星栽培。

投稿日期：2017 年 10 月 10 日；接受日期：2017 年 11 月 28 日。
[*] 通訊作者：chinzue@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

國際間已記錄可感染宮燈百合之病毒種類為胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV)，引起植株矮化及葉片壞疽條斑病徵 (stunt and necrotic streak) (Shiota & Uematsu 1998)。宮燈百合及火焰百合 (又名嘉蘭) 分類上原屬於百合科 (Liliaceae)，但依據被子植物 APG IV 分類法 (Angiosperm Phylogeny Group)，二者在基因上之親緣關係，進一步分類至秋水仙科 (Colchicaceae) (https://zh.wikipedia.org/wiki/Colchicaceae)；但中國大陸及台灣之分類仍將火焰百合及宮燈百合歸類於百合科。

嘉蘭條斑嵌紋病毒 [*Gloriosa stripe mosaic virus*; GSMV; 國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) code: 00.057.0.01.026] 為已知之 *Potyvirus* 屬病毒成員，此病毒首次於 1974 年由德國學者 (Koenig & Lesemann 1974) 於火焰百合 (嘉蘭) 上 (*Gloriosa rothschildiana*) 所報導。之後於荷蘭 (Pham *et al*. 2011) 和美國 (Mollov *et al*. 2017) 也在火焰百合上發現有 GSMV。Mollov *et al*. (2017) 發現 GSMV 引起火焰百合 (*Gloriosa superba* ‘Rothschildiana’) 全株葉片嵌紋和黃化條斑，而 Wang *et al*. (2007) 新命名之火焰百合嵌紋病毒 (*Glory lily mosaic virus*; GLMV; GenBank EU250360) 的病毒分離株，經由 Pham *et al*. (2011) 報導由病毒核酸序列分析比對結果顯示，GLMV 應屬於 GSMV 病毒之成員，二者為相同病毒。目前火焰百合 (*Gloriosa* spp.) 上已記錄的病毒有 3 種 (Araki *et al*. 1985)， 包 括 CMV、*Gloriosa fleck virus* (GlFV) 和 GSMV。而 GSMV 和 CMV 為宮燈百合和火焰百合上發生的共同病毒。

近年來依據 ICTV (https://talk.ictvonline.org) 所公布的 *Potyvirus* 屬病毒分類標準：potyvirus 病毒型態為長絲狀，病毒顆粒大小約 680–900 nm；具有分子量約 30–47 kDa 的蛋白質外鞘，其基因體乃由分子量大小約 9.7 kb 的單股 RNA (positive sense ssRNA) 所組成。*Potyvirus* 屬病毒整個基因體僅具有一個轉譯架構 (open reading frame; ORF)，其基因表現時先合成一條分子量約 340–368 kDa 的大蛋白 (polyprotein)，再由病毒本身所合成的蛋白酶進行蛋白質裂解成多個具有不同功能之蛋白產物，包括 P1-Pro (protein 1 protease)、HC-Pro (helper component protease)、P3 (protein 3)、6k1 (6-kDa peptide 1)、CI (cytoplasmic inclusion)、6k2 (6-kDa peptide 2)、NIa-Pro (nuclear inclusion A protease)、NIb (nuclear inclusion B) 和 CP (coat protein)。

*Potyvirus* 屬病毒分類上可由病毒顆粒型態、媒介昆蟲種類、血清親緣關係和核酸分子特性等方面鑑定之；ICTV 對於 *Potyvirus* 屬病毒的種 (species) 分類界定，主要依據：(1) 完整大蛋白的核苷酸相同度小於 76%、胺基酸小於 82% 者；(2) 若採用特定蛋白區域的核苷酸相同度，則於 P1 區者小於 58%，於其他區者則小於 74–78%；(3) CP 的核苷酸相同度小於 76–77%、胺基酸小於 80% 者 (Adams *et al*. 2005)。此外，*Potyvirus* 屬病毒也可依據其 3’ 端非轉譯區 (3’-noncoding region; 3’-NCR) 之核苷酸序列比對，在高於 80% 相同度者鑑定為相同種的 potyvirus 病毒 (Frenkel *et al*. 1989)。

宮燈百合為台灣新興的球根花卉，國內主要以種球進口生產切花，以其花朵金黃色彩加上切花造型特性，常被利用於花藝設計使用。宮燈百合可用種子和種球做繁殖，種球有兩個芽點可產生兩個新子球；近年來有部分國內花農可以自行成功繁殖宮燈百合。目前種球主要以進口輸入，對於可能隨種球進口而輸入國內之病毒種類，有必要建立自主檢測能力以因應。本研究以進口的宮燈百合種球為樣品，分別以核酸分子定序及血清學免疫法鑑定 GSMV 發生於宮燈百合上。並進一步完成其對應大蛋白的全長度核酸定序，依據核甘酸與胺基酸序列分析，以確認其為 *Potyvirus* 屬的 GSMV 病毒成員；利用細菌生合成系統表現病毒 CP 做為抗原，以製備可供檢測 GSMV 的多元抗體；設計可鑑別宮燈百合及火焰百合 GSMV 分離株的反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 檢測用引子對等。本研究為首次紀錄由宮燈百合上檢出 GSMV，並完成其全長度大蛋白的核酸序列定序而登錄於 GenBank 者，已研製的

多元抗體和核酸引子對均已實用於進口宮燈百合之病毒監測。

# 材料與方法

## 材料來源與保存

本研究採用紐西蘭進口的宮燈百合球根種植後新發之葉片組織，於 RT-PCR 中，可與 *Potyvirus* 屬簡併式引子對 HRP-5/Oligo-dT$_{(14)}$ (5’ATGATHGARKCNTGGGG3’/5’GCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTT3’) (Pappu *et al*. 1998; Chen *et al*. 2006) 反應而呈現特定核酸片段產物的葉片組織進行試驗，並將檢出有病毒正反應的罹病葉片浸漬於 50% (v/v) 甘油中，保存於 -20℃下供後續試驗所需。

宮燈百合材料分別於 2005 年和 2008 年所收集保存，罹病植株葉片呈現輕微嵌紋或不明顯徵狀；另以 2015 年採集之火焰百合做比較試驗，罹病植株葉片出現嵌紋或褐化條斑。

## 病毒 3’ 端核酸片段之增幅、選殖與定序分析

本研究之受測樣品，包括宮燈百合及火焰百合病毒罹病組織，分別以 RT-PCR 法進行其 3' 端核酸片段之增幅後，選殖特定核酸片段進行核苷酸定序分析，以取得不同病毒分離株之 CP 核酸序列。採用之反應條件詳述如下。

**單步驟 RT-PCR 法**：取 0.1 g 之受測葉片，加入液態氮研磨均勻後，依據市售的植物全量核酸純化試劑組 (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) 之步驟，進行供試植物全量核醣核酸 (RNA) 之萃取。以純化所得之 RNA 為模板，使用可增幅 *Potyvirus* 屬病毒核酸 3’ 端 (3’-terminal region) 約 1.3 kbp 之簡併式引子對 HRP-5/Oligo-dT$_{(14)}$ (Pappu *et al*. 1998; Chen *et al*. 2006) 進行單步驟 RT-PCR 反應。

RT-PCR 依據試劑組 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 之配方，於每一 25 μL 反應液中分別加入 1 μL 之全量 RNA、12.5 μL 之 2× Reaction Mix、0.5 μL 之 SuperScript III RT-/Platinum Taq Mix、各 1 μL 之 10 μM 上游和下游引子和 9 μL 之 DEPC-treated water。所有試劑混合均勻後，於熱循環反應儀 (T3000 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Germany) 中進行。設定反應程序為：50℃下進行反轉錄 30 min、94℃變性 1 min；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94℃下變性 1 min、52℃下煉合 1 min 30 s、72℃下聚合 2 min，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 6 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析判讀結果。

**核酸片段選殖和核苷酸序列分析**：經由引子對 HRP-5/Oligo-dT$_{(14)}$ 於 RT-PCR 反應中所增幅出預估 1.3 kbp 的核酸片段，選殖於 pGEM-T Easy Vector Systems (Promaga, Madison, WI, USA) 載體上，篩選出含有此特定嵌入序列 (insert sequence) 選殖株送交核酸定序公司 (明欣生物科技有限公司，台灣台北市)，以自動核酸定序儀分析其核苷酸序列，進行核酸選殖與定序分析，所得序列以 Vector NTI Suite (InforMax, Inc., Bethesda, MD, USA) 分析軟體進行分析，並與美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 基因資料庫 (GenBank) 已登錄的 GSMV 和 *Potyvirus* 屬病毒之 CP 核苷酸和胺基酸序列，以及 3'-NCR 序列進行比對分析。

## 病毒大蛋白之全長度核酸序列選殖及解序

將 2005 年所收集的宮燈百合病毒 CB 分離株，以其罹病組織所抽取之全量核酸為來源，先以Poty2/Oligo-dT$_{(14)}$ (5’GCGGGATCCGTNTGYGTNGAYGAYTTTYAAYAA3’/5’GCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTT3’) 引子對所增幅出之病毒 3’ 端約 2.0 kbp 核酸片段已知序列為基礎，與GenBank資料庫上之植物病毒序列比對結果，其和 *Potyvirus* 屬成員 *Chilli veinal mottle virus* (CVMV) (NC_005778 和 AB012221) 的核苷酸序列相似度最高 (比對當時為 2005–2006 年期間，尚未有 GSMV 的核酸序列公告)，乃先以 CVMV 已知之全長度基因體為參考基礎，設計可包含全長度大蛋白核苷酸序列之相關引子對，以 RT-PCR 法配合不同引子對，分不同片段進行 CB 分離株全長度核酸序列之選殖與定序 (圖 1A)。所設計使用之引子對組合包括 5’CBu/5’CB1761d、

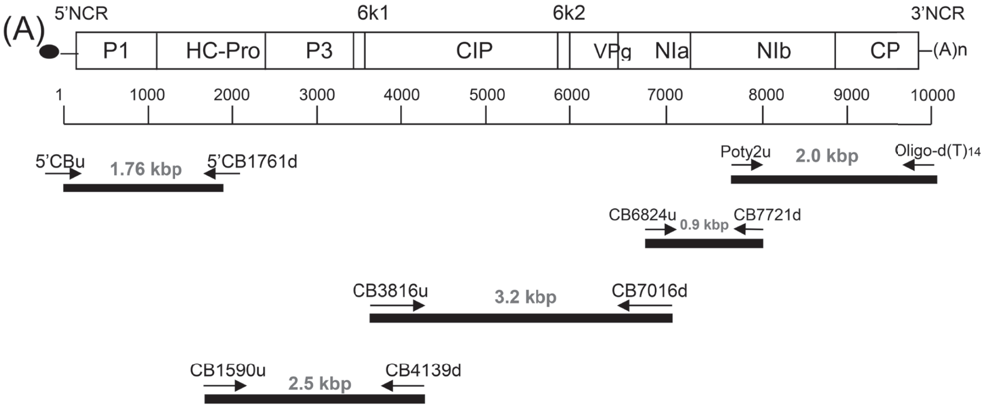
CB1590u/CB4139d、CB3816u/CB7016d、CB6824u/CB7721d、Poty2u/Oligo-d(T)$_{14}$，各引子之序列詳如圖 1B。單步驟 RT-PCR 增幅之黏合溫度，除 5’CBu/5’CB1761d 於 45℃進行外，其他各引子對之黏合溫度為 50–52℃。

接近 CB 基因體 5’ 端之核苷酸片段，乃參考由 CB1590u/CB4139d 引子對所增幅出之 2.5 kbp 核酸片段序列 (圖 1A) 與當時 GenBank 上已登錄者相同度最高之 3 種 *Potyvirus* 屬病毒的核苷酸序列，分別為 CVMV (NC_005778)、*Plum pox virus* (PPV) (NC001445) 和 *Turnip mosaic virus* (TuMV) (AB252131)；以此 3 種病毒的 5' 端序列設計簡併式引子對 5'CBu/5'CB1761d，於黏合溫度為 45℃下進行單步驟 RT-PCR 增幅，預估增幅出之核酸片段大小約 1.76 kbp。

針對全長度基因體之選殖，將上述各不同引子組增幅所得之核酸片段，構築於 TOPO TA-PCR Ⅱ載體上 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)，經篩選出含有特定片段之嵌入序列選殖株各 3 個，進行核苷酸定序分析。病毒之 5' 端核苷酸序列，將不採計簡併式引子 5'CBu 序列所黏合處之 21 個核苷酸。

## 不同 GSMV 分離株 CP 之類緣關係分析

本研究以 RT-PCR 法，分別由宮燈百合和火焰百合上之 *Potyvirus* 屬病毒分離株，包括 CB 及其他 2 個宮燈百合分離株 (CB4 和 CB18)，和 3 個火焰百合分離株 (GL2、GL3 和 GL4)，以 *Potyvirus* 屬病毒的簡併式引子對 HRP 5/Oligo-dT$_{(14)}$ 進行其 3’ 端約 1.3 kbp 之核酸片段增幅，




(B)

5’CBu: 5’-AARYATWMAARCWMMMMAMRA-3’
5’CB1761d: 5’-AgATTCACCTTCCAA-3’
CB1590u: 5’-TACCATgCAAAAAggTTCTT-3’
CB4139d: 5’-CCKCCKggYgTKgCWgANACYTT-3’
CB3816u: 5’-ACgTgACgggAgAgTgTTgTTA-3’
CB7016d: 5’-CCTTTgACAACATgCTTCgT-3’
CB6824u: 5’-TRCCRAARgAYKTYCC-3’
CB7721d:5’-CggATTTggAgTACTgCATTTAAT-3’
Poty2u: 5’-gCgggATCCgTNTgYgTNgAYgAYTTTYAAYAA-3’
Oligo-d(T)$_{14}$: 5’-GCGGCCGC(T)$_{14}$-3’

**圖 1.**　GSMV 全長度基因體之增幅與構築策略。

**Fig. 1.**　The strategy for determination of the complete genomic nucleotide sequence of the *Gloriosa stripe mosaic virus* CB isolate (GSMV-CB). (A) Schematic representation of the genetic structure of GSMV-CB and the overlapped cDNA fragments amplified from reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) by the primers. Black bars represent length of amplified DNA fragments. (B) Sequences of the primers used in RT-PCR.

選用對應 CP 區域之核苷酸和胺基酸序列，以及 3’-NCR 核苷酸序列與 GenBank 上所登錄之不同寄主來源的 GSMV 分離株，以 Vector NTI Suite 分析軟體進行序列相同度 (% identity) 分析；另進行類緣關係分析 (phylogenetic analysis)，以 CVMV (NC_005778) 和 TuMV (AB252131) 做為外群 (outgroup)，依據 Tomimura *et al*. (2003) 所發表的方法進行。所有序列先以 CLUSTAL X version 1.8 (Thompson *et al*. 1997) 彙整分析後，再利用 PAUP 4.0 程式，以 Neighbor-Joining (NJ) 方法建構親緣關係樹，並結合 Bootstrap resampling method (BRM) 法 (Felsenstein 1985; Thompson *et al*. 1997) 評估關係樹分群的統計顯著性。

## GSMV 鑑別性引子對之設計與測試

依據 CB 分離株之 CP 核苷酸序列設計 3 組引子對，分別有 3 條不同上游引子 GSMV715u (5’TGTGGATGCTGGTGTTCT3’)、GSMV660u (5’CAG GCC CACAGGCACA3’) 和 GSMV500u (5’GCCAAACCAAGATCGA3’) 搭配共同下游 GSMVd (5’TTCCTGTGTTCCTACCTT3’) 引子。取宮燈百合和火焰百合罹病組織，純化其全量核酸做為模板進行單步驟 RT-PCR 反應。反應條件為 50℃下進行反轉錄 30 min、94℃變性 2 min；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94℃下變性 40 s、52℃下煉合 40 s、72℃下聚合 40 s，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 6 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析判讀結果。

各組引子對可增幅出之核酸片段產物預估分別是 GSMV715u/GSMVd 為 715 bp、GSMV660u/GSMVd 為 660 bp 和 GSMV500u/GSMVd 為 500 bp，依據預估之產物評估各組引子對之鑑別性檢測效果。

## CB 分離株 CP 表現及多元抗體製備

依據 CB 3’ 端核酸序列定序結果，設計可增幅其全長度 CP 核苷酸序列之引子對 CBCPEu (5’GTTTATCATATGTCTGGGTCTAGTGTGGATGCT3’；劃底線者為 *NdeI* 切位) 和 CBCPEd (5’CTCATATAATACTACTAACACACTCGAGTCACAA3’；劃雙底線者為 *XhoI* 切位)。以宮燈百合 CB 罹病組織全量 RNA 為模板，參照上述 RT-PCR 反應條件，以此引子對，於 52℃下煉合 1 min 30 s，進行 30 個 PCR 循環增幅。

將增幅所得之 CB CP 核酸片段以 *NdeI* 和 *XhoI* 切割，剪接於同樣經 *NdeI* 和 *XhoI* 切割之 pET28b(+) 載體 (Novagen, Inc., Madison, WI, USA)，並轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3)。轉型株以 M9 培養基培養，並以 1 mg $mL^{-1}$ 之 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 誘導蛋白質之表現 (Li *et al*. 1998)。培養之菌液以 5,900× *g* 轉速離心 10 min 後，沉澱物以 0.5 M Tris-EDTA (pH 8.0) 緩衝液溶解均勻，並進行十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) 分析，再經西方墨點法以市售 *Potyvirus* 屬單元抗體 (Agdia, Inc., Elkhart, IN, USA) 確認 CB CP 抗原之表現。

進一步選用確定有表現 CB CP 之選殖株進行大量表現蛋白之誘導與純化 (Li *et al*. 1998)，將純化之表現蛋白濃縮為 1 mg $mL^{-1}$ 以做為抗原，並送交濁水溪生物科技有限公司 (桃園市，台灣) 進行每週一 1 次、連續 4 wk 的兔免疫注射以製備多元抗體。

## 抗血清免疫檢測分析

**間接式-酵素連結免疫吸附反應 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)**：本試驗參考以往報告進行之 (Clark & Adams 1977; Chang *et al*. 1988)，以 indirect ELISA 法進行。取 0.1 g 之受測樣品組織，以 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後，加入 96 孔 ELISA 反應盤內，每樣品加 2 孔 (100 μL/ 孔) 為 2 個重複，置於 37℃定溫 3–4 h 進行覆膜反應 (coating reaction)，然後以 1× PBST (Phosphate buffered saline with Tween-20) 緩衝液 (137 mM NaC1,1.5 mM $KH_2PO_4$, 1 mM $Na_2HPO_4$, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 沖洗 3 次；其次分別加入欲檢定之病毒抗體後，放置在 25℃定溫箱反應 2–3 h；爾後以 1× PBST 緩衝液沖洗 3 次，再加入已稀釋 6,000× 之山羊抗兔二次抗體 (goat anti-rabbit immunoglobin, Jackson, West Grove, PA, USA) (100 μL/ 孔)，置於 25℃之定溫箱反應 2–3 h；最後再以 1× PBST 緩衝液

沖洗 4 次後，再以 150 µL/孔之比例加入濃度為 1 mg mL$^{-1}$ 之鹼性磷酸酶酵素基質 (p-NPP) (Amresco, Solon Ind., Solon, OH, USA) 進行呈色反應。反應 30 min 後，以 ELISA 讀值儀 (PTI max microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，做為評估病毒濃度高低之依據。樣品吸光值大於 2 倍之健康葉片吸光值者，判讀為正反應。

**西方墨點法**：取 0.1 g 受測樣品之組織，置於 1.5 mL 微量離心管內，加入液態氮研磨均質，加入 200 µL 樣品處理液混勻 (Chen & Chiang 2017)。再加入 200 µL 之 LDS 溶液 (Laemmli 1970) 混勻，於沸水中悶熱 3–5 min，以 5,900× *g* 離心 5 min 後取上清液進行電泳分析。處理後之樣品經 SDS-PAGE 後，取膠體轉漬於聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride; PVDF) 膜 (Millipore Co., Burlington, MA, USA)，再與受測之病毒抗體進行反應。

### CB 多元抗體應用於宮燈百合和火焰百合罹病株之檢測

選用進口宮燈百合和田間火焰百合，採取其葉片分別以 indirect ELISA 及西方墨點法與自製 CB 多元抗體進行反應，流程詳如前述。於 indirect ELISA 法中，本試驗選用其他種 potyvirus 病毒罹病組織進行檢測試驗 (表 1)，以評估本自製多元抗體之檢測專一性。

## 結果

### 宮燈百合 CB 分離株之大蛋白全長度核酸序列分析

本研究以宮燈百合 CB 罹病葉片純化之全量核酸為模板，先以 Poty2/Oligo-dT$_{(14)}$ 引子對進行 RT-PCR，於電泳分析中獲得與預估值相符合約 2 kbp 核酸片段，經選殖與定序後確定有一個轉譯架構 (ORF)，為一種具有 *Potyvirus* 屬病毒基因體 3’ 端特質之核酸片段。進一步就 CB 分離株全長度核酸序列之選殖與定序結果，在不採計 5’ 端由簡併式引子 5’CBu 序列所黏合處之 21 個核苷酸後，共解得 9,455 個核苷酸，已登錄於 GenBank 取得登錄序號為 EF427894。

**表 1.**　宮燈百合 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) 多元抗體於間接酵素連結免疫吸附法中檢測不同 *Potyvirus* 屬病毒之效果。

**Table 1.**　Reactions of polyclonal antibody against *Gloriosa stripe mosaic viru*s (GSMV) with different potyviruses in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

| Antigen[z] | ELISA reading ($A_{405nm}$)[y] |
|---|---|
| GSMV-CB | 2.40 |
| GSMV-CB4 | 2.25 |
| GSMV-CB18 | 3.26 |
| GSMV-GL1 | 0.56 |
| GSMV-GL2 | 3.49 |
| GSMV-GL3 | 3.12 |
| GSMV-GL4 | 1.15 |
| TuMV | 1.96 |
| BlCMV | 0.09 |
| BYMV | 0.15 |
| CLLV | 0.13 |
| DsMV | 0.08 |
| KoMV | 0.09 |
| LiMV | 0.28 |
| PVY | 0.08 |
| ZYMV | 0.32 |
| D-CK | 3.07 |
| 2H-CK | 0.20 |

[z] Antigens of GSMV-CB isolates obtained from diseased Christmas bells tissues and GSMV-GL isolates from diseased gloriosa. Different *Potyvirus* isolates including *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Black cowpea mosaic* (BlCMV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Calla lily latent virus* (CLLV), *Dasheen mosaic virus* (DsMV), *Konjac mosaic virus* (KoMV), *Lily mottle virus* (LiMV), *Potato virus Y* (PVY), and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) were used. The bacterial expressed protein (D-CK) was used as positive control and healthy Christmas bells tissues (H-CK) was used as negative control antigens.

[y] The absorbance values ($A_{405nm}$) are an average of two replicate wells. Those reactivities lower than two times of the healthy control (2H-CK) are considered as negative reactions.

分析所解得的 9,455 個核苷酸序列之 CB 分離株基因體結構，其包含有部分的 5’ 端非轉譯區 (5’-NCR) 約 111 個核苷酸和 3’-NCR 的 188 個核苷酸；含有一個大蛋白轉譯架構，蛋白轉譯起始位置為核苷酸 (nucleotide) AUG triplet，由 9,156 個核苷酸對應產生一條含 3,052 個胺基酸的大蛋白；對應不同功能蛋白之核酸序列長度 (核苷酸/胺基酸) 分別為：P1 蛋白 (843/281)、

HC-Pro 蛋白 (1,371/457)、P3 蛋白 (1,041/347)、6k1 蛋白 (153/51)、CI 蛋白 (1,929/643)、6k2 蛋白 (159/53)、NIa-VPg 蛋白 (570/190)、NIa-Pro 蛋白 (726/242)、NIb 蛋白 (1,566/522)、CP 蛋白 (798/266)。因此，對應 CP 有 798 個核苷酸，可轉譯出 266 個胺基酸，預估其分子量約為 29.3 kDa，CP 起始位置第 6–8 個胺基酸為 DAG triplet，乃 *Potyvirus* 屬病毒可被蚜蟲傳播之分子證據 (Atreya *et al*. 1991)。

依據 *Potyvirus* 屬病毒胺基酸序列特性 (Ward *et al*. 1992; Adams *et al*. 2005) 歸納本研究所解得之 GSMV-CB 分離株基因體對應的蛋白分解酶辨識位址 (protease recognition site)，分別是：P1 protease 為 LRQY/S、HC-Pro protease 為 YRVG/G；NIa protease 於 P3/6k1、6k1/CIP 及 CIP/6k2 之辨識位址分別為 VGHQ/D、VGHQ/S 及 VRHQ/S，於 6k2/VPg、VPg/NIa、NIa/NIb 及 NIb/CP 之辨識位址分別為 VQHQ/G、VGHE/A、VECQ/A 及 VYHQ/S。上述針對 CB 分離株的基因體分析結果，均符合 *Potyvirus* 屬病毒的特性。

## 不同 GSMV 分離株之 CP 核酸序列分析

本研究之宮燈百合病毒分離株 (CB、CB4 和 CB18)，其與 GenBank 上已登錄之火焰百合 (GSMV, EU042761; Pham *et al*. 2011) 的 CP 核苷酸和胺基酸序列相同度分別為 94.5–95.5% 和 91.4–94.0% 之間 (表 2)，而 3'-NCR 核苷酸序列相同度為 87.7–88.2%。而由田間採集的 3 個火焰百合病毒分離株 (代號 GL2、GL3 和 GL4)，其和 GSMV (EU042761) CP 核苷酸和胺基酸序列之相同度為 82.6–84.0% 和 86.5–89.8% 之間；而 3’-NCR 核苷酸序列相同度為 82.4–85.0% (表 2)。

**表 2.** 火焰百合 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) Pham 分離株與其他已知 GSMV 病毒之鞘蛋白核酸和 3’ 端非轉譯區序列相同度比較。

**Table 2.** Comparison of the identities of nucleic acid sequences of the coat protein (CP) and 3’-noncoding region (3’-NCR) of the *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) Pham isolate from gloriosa with those of other known GSMV isolates available in GenBank.

| Source[y] | Acc. no. | % identity of[z] | | |
|---|---|---|---|---|
| | | CP-nt | CP-aa | 3’-NCR |
| Gloriosa-Pham | EU042761 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Christmas bells CB | EF427894 | 94.5 | 91.4 | 87.7 |
| Christmas bells CB4 | KT764122 | 95.5 | 94.0 | 88.2 |
| Christmas bells CB18 | KT764123 | 95.5 | 93.6 | 88.2 |
| Gloriosa GL2 | KT764120 | 82.7 | 87.2 | 82.4 |
| Gloriosa GL3 | KT764124 | 84.0 | 89.8 | 85.0 |
| Gloriosa GL4 | KT764121 | 82.6 | 86.5 | 82.9 |
| Gloriosa MD1 | KT602853 | 93.6 | 90.6 | N |
| Gloriosa MD2 | KT602854 | 92.1 | 89.8 | N |
| Gloriosa MD3 | KT602855 | 82.5 | 86.5 | N |
| Gloriosa-Tw[x] | EU250360 | 82.8 | 87.6 | 81.8 |
| CVMV[w] | NC_005778 | 60.3 | 60.6 | 38.5 |
| PPV | NC_001445 | 54.8 | 51.7 | 42.6 |
| TuMV | AB252131 | 57.0 | 54.5 | 41.3 |

[z] Percent identities (%) of the respective nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequences were analyzed by the Vector NTI Suite (InforMax, Inc., Bethesda, MD, USA). N, there is no available nucleotide sequences of 3’-noncoding region (3’-NCR) in GenBank.

[y] The sequence of GSMV isolate (EU042761, Pham *et al*. 2011) was used for leader comparison. Isolates collected from Christmas bells were CB, CB4 and CB18; from gloriosa were GL2, GL3 and GL4 in this study; MD1–MD3 were gloriosa isolates reported by Mollov *et al*. (2017).

[x] The Glory lily mosaic virus (synonym to GSMV) collected from gloriosa was submitted directly to GenBank by Wang *et al*. (2007).

[w] Three *Potyvirus* isolates, *Chili veinal mottle virus* (CVMV), *Plum pox virus* (PPV), and *Turnip mosaic virus* (TuMV) available in GenBank were used for comparison.

但若以 CB 分離株序列為主進行之相同度分析，則與本研究之宮燈百合和火焰百合，以及 GSMV (EU042761) 分離株間之 CP 胺基酸序列和 3'-NCR 核苷酸序列相同度分別高於 91.0% 和 85.0% 以上 (結果未出示)。由 *Potyvirus* 屬病毒之核酸分子鑑定標準，此等核酸分子分析結果顯示，本研究所獲得之宮燈百合和火焰百合病毒分離株均符合 *Potyvirus* 屬之 GSMV 成員。

本研究由宮燈百合和火焰百合分離所得之病毒核酸序列，均已登錄於 GenBank 取得序號分別為宮燈百合CB (EF427894)、CB4 (KT764122)、CB18 (KT764123)；火焰百合 GL2 (KT764120)、GL3 (KT764124) 及GL4 (KT764121)。而本研究之宮燈百合和火焰百合於 CP 胺基酸序列高於 91%，可藉由 CP 區域設計可同時或鑑別性檢測此兩種寄主來源 GSMV 之引子對，應用於 RT-PCR 檢測法篩檢 GSMV 病毒。

## 不同 GSMV 分離株 CP 之類緣關係分析

由本研究所得之不同宮燈百合和火焰百合 GSMV 分離株，以其全長度 CP 之胺基酸序列進行比對以及類緣關係分析。由其胺基酸比對 (alignment) 結果顯示 (圖 2)，本研究的 3 個宮燈百合分離株 (CB、CB4 和 CB18) 與荷蘭學者發表的火焰百合分離株 (EF042761) (Pham *et al*. 2011) 之間，在 CP 胺基酸起始第 20、22、42、61 和 91 的胺基酸種類屬同一類型，而與其他火焰百合分離株者不同。此不同位置之胺基酸種類，來自宮燈百合 GSMV 分離株者分別為 Serine$^{20th}$ (S)、S$^{22nd}$、Alanine$^{42nd}$ (A)、Glutamate$^{61st}$ (E)、Leucine$^{91st}$ (L)，此與大部分的火焰百合 GSMV 分離株為 Glycine$^{20th}$ (G)、A$^{22nd}$、Threonine$^{42nd}$ (T)、Glutamine$^{61st}$ (Q)、S$^{91st}$ 而有所差異 (圖 2)。

在類緣分析的樹狀圖上，以 CVMV 和 TuMV 做為外群比對下，宮燈百合及火焰百合來源的病毒分離株則同屬於 GSMV 分群。然而在此 GSMV 類群內，進一步可發現本研究的 3 個宮燈百合分離株與荷蘭學者發表的火焰百合分離株 (EF042761) 之類緣關係較相近，屬於同一演化分群；而與本研究的火燄百合分離株 (GL2, GL3, GL4) 位於不同演化分群 (圖 3)。

## 宮燈百合 GSMV 專一性引子對及 RT-PCR 檢測

本研究依據 CB 分離株的 CP 核苷酸序列所設計的 3 組簡併式引子對 (上游引子分別為 GSMV715u、GSMV660u 及 GSMV500u，搭配共同下游 GSMVd 引子)，於 RT-PCR 反應中，GSMV660u/GSMVd 和 GSMV500u/GSMVd 的組合，均可同時檢測出宮燈百合及火焰百合上之 GSMV，核酸片段產物分子量分別為 660 bp 和 500 bp (圖 4)；而引子對 GSMV715u/GSMVd 僅可檢測到宮燈百合 GSMV 分離株之 715 bp 核酸片段產物，而對火焰百合 GSMV 分離株則無預期的 715 bp 片段被增幅出，雖有大小約 100 bp 屬於植物葉綠體的非專一性條帶 (圖 4)，但不影響判讀結果。本結果顯示，GSMV715u/GSMVd 引子對可應用於宮燈百合和火焰百合 GSMV 之鑑別性檢測。

## 宮燈百合 GSMV-CB 分離株 CP 表現及其多元抗體之檢測效果評估

宮燈百合 CB 分離株之 CP 表現蛋白 (BEP-CB)，為預估包含有 287 個胺基酸的融合性蛋白 (CB CP 的 N 端外加有 pET28b 表現載體的 21 個胺基酸 )，於 SDS-PAGE 電泳分析中可見 BEPCB 融合性表現蛋白之分子量約為 31.6 kDa，與預估值相符且為不帶有 CB 核酸嵌入序列的 pET28b 表現載體所有 (圖 5A)。於西方墨點法中，市售 *Potyvirus* 屬病毒的單株抗體 (monoclonal antibody) 可與 BEPCB 表現蛋白產生正反應 (圖 5B)，顯示本研究之 BEPCB 表現蛋白具有 *Potyvirus* 病毒之抗原特性；以 BEPCB 表現蛋白為抗原所製備之多元抗體，可與其同源的BEPCB表現蛋白之31.6 kDa產生正反應 (圖 5C)。

進一步將 GSMV-CB 多元抗體與宮燈百合和火焰百合不同GSMV罹病組織進行免疫反應，均可於預估病毒 CP 分子量位址 (約 29.3 kDa) 產生正反應，然而罹病組織均可見有小於 29.3 kDa 的蛋白條帶產生 (圖 6)。GSMV-CB 多元抗體並不與宮燈百合和火焰百合的健康組織對照品產

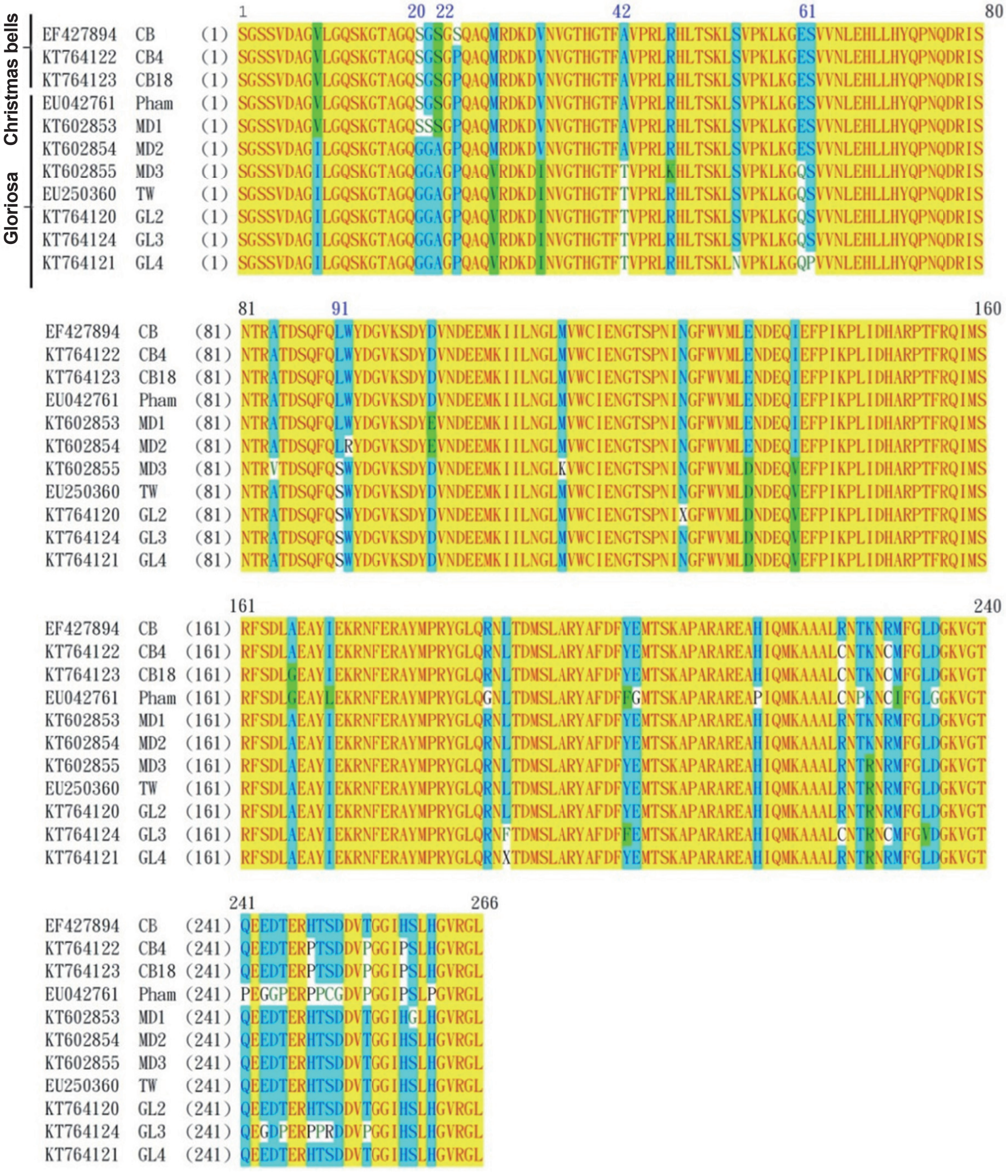



**圖 2.** 不同 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) 分離株鞘蛋白胺基酸序列比對圖。

**Fig. 2.** Alignment of the amino acid sequences of coat proteins of different *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) isolates. The coat protein regions of 11 GSMV isolates from Christmas bells and gloriosa were compared. Isolates collected from Christmas bells were CB, CB4, and CB18; from gloriosa were GL2, GL3, and GL4 in this study; MD1–MD3 were gloriosa isolates reported by Mollov *et al*. (2017). Tw was the *Glory lily mosaic virus* (synonym to GSMV) collected from gloriosa and submitted directly to GenBank by Wang *et al*. (2007). The different amino acids at $20^{th}$, $22^{nd}$, $42^{nd}$, $61^{st}$ and $91^{st}$ among isolates of Christmas bells and Gloria were shown.

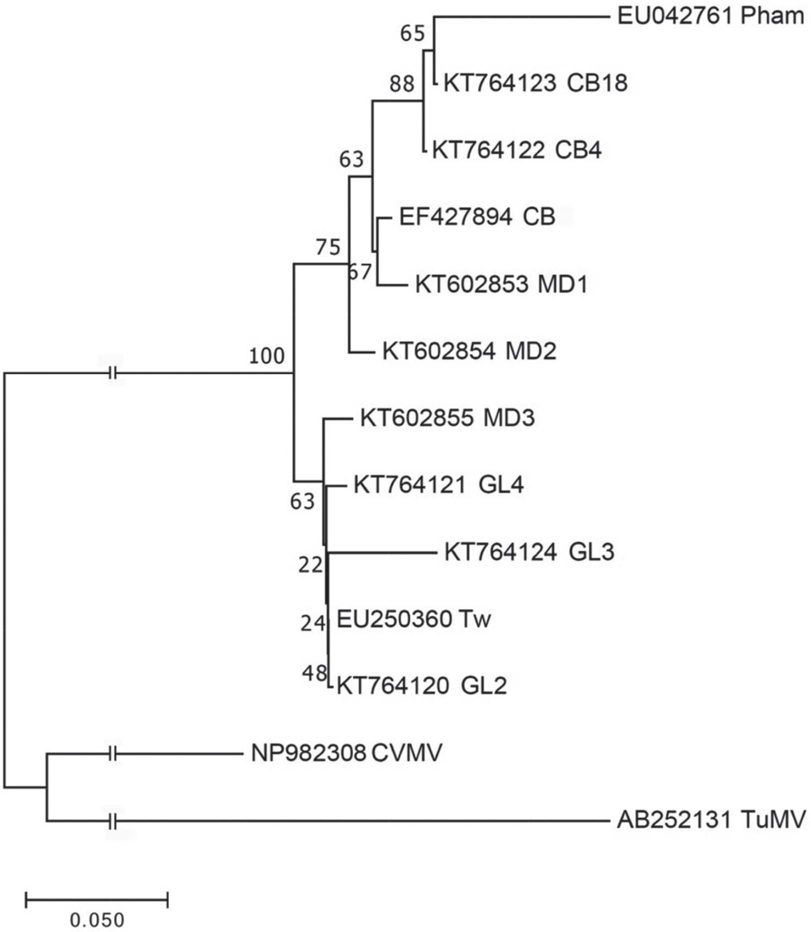



**圖 3.** 不同寄主來源 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) 分離株之類緣分析。

**Fig. 3.** A phylogram derived from the analysis of genetic distances based on the amino acid sequences of the coat proteins of 11 isolates of *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV). The tree was constructed using the neighbour-joining (NJ) algorithm with the bootstrap resampling method (1,000 random resamplings), using PAUP 4.0. Horizontal branch length is drawn according to the scale bar indicating 50 substitutions per 1,000 amino acid positions per site. Isolates collected from Christmas bells were CB, CB4, and CB18; from gloriosa were GL2, GL3, and GL4 in this study; MD1–MD3 were gloriosa isolates reported by Mollov *et al*. (2017). Tw was the *Glory lily mosaic virus* (synonym to GSMV) collected from gloriosa and submitted directly to GenBank by Wang *et al*. (2007). Sequences of *Chilli veinal mottle virus* (CVMV) and *Turnip mosaic virus* (TuMV) isolates were used as outgroup elements.

生反應，在此兩種寄主上具有對 GSMV 病毒的免疫檢測效果。

本研究結果顯示，BEPCB 表現蛋白除可做為 GSMV 免疫檢測之正對照品外，以其為抗原所製備出之多元抗體，在西方墨點法中可成功應用於宮燈百合和火焰百合 GSMV 罹病組織的檢測 (圖 6)。

於 indirect ELISA 反應中，CB 多元抗體對於其同源抗原之 BEPCB 表現蛋白的反應值高於 3.0，為正反應讀值，且與宮燈百合和火焰百合罹病組織之讀值均為正反應值，介於 0.56–3.49 間 (表 1)。然而，CB 多元抗體於 indirect ELISA 中也可與 TuMV 產生高於 1.0 之正反應讀值 (表 1)，且進一步以西方墨點法檢測發現此多元抗體也會與 TuMV 的 CP 條帶產生正反應，但仍可依分子量大小與 GSMV-CB 做區分 (圖 6)。上述結

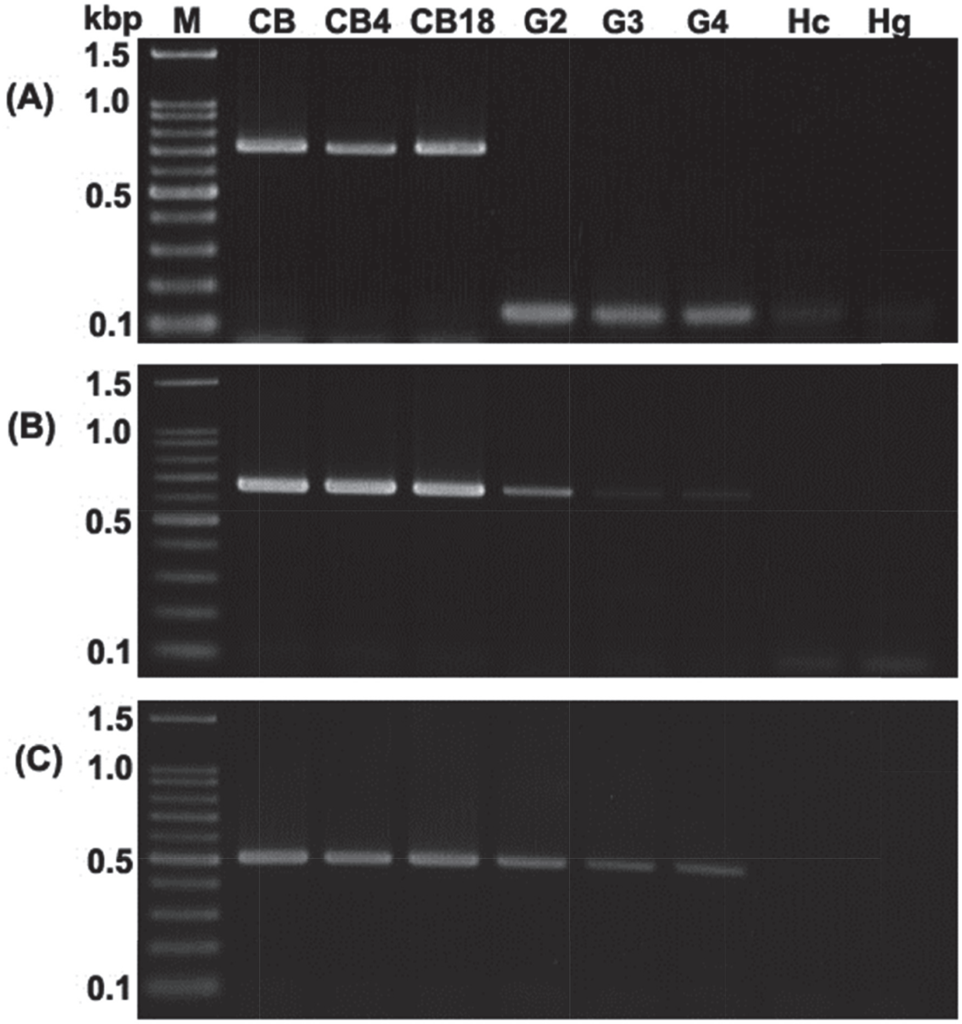



**圖 4.** GSMV 引子組對於 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) 不同寄主來源分離株之鑑別性檢測。利用 3 組引子對於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 中進行宮燈百合和火焰百合 GSMV 罹病株之病毒核酸分子檢測。以 (A) GSMV715u/GSMVd、(B) GSMV660u/GSMVd 和 (C) GSMV500u/GSMVd 三組引子對增幅出之核酸片段產物大小，預估分別為 715 bp、660 bp 和 500 bp。行 M：100 bp DNA 標準標幟。行 CB、CB4 和 CB18：宮燈百合 GSMV 分離株；行 G2、G3、G4：火焰百合 GSMV 罹病組織；行 Hc：健康宮燈百合組織；行 Hg：健康火焰百合組織。

**Fig. 4.** The efficiencies of designed primer pairs for distinguishing the *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) isolates in reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Three primer sets were used for reaction with GSMV-infected Christmas bells and gloriosa. Lane M: 100-bp ladder DNA molecular marker; The predict amplified DNA fragments by three primer pairs were 715 bp by (A) GSMV715u/GSMVd, 660 bp by (B) GSMV660u/GSMVd, and 500 bp by (C) GSMV500u/GSMVd, respectively. Lane M: 100-bp ladder DNA molecular marker; lanes CB, CB4 and CB18: GSMV-CB isolates of Christmas bells; lanes G2, G3, and G4: GSMV isolates of gloriosas; lane Hc: healthy Christmas bells; and lane Hg: healthy gloriosa.

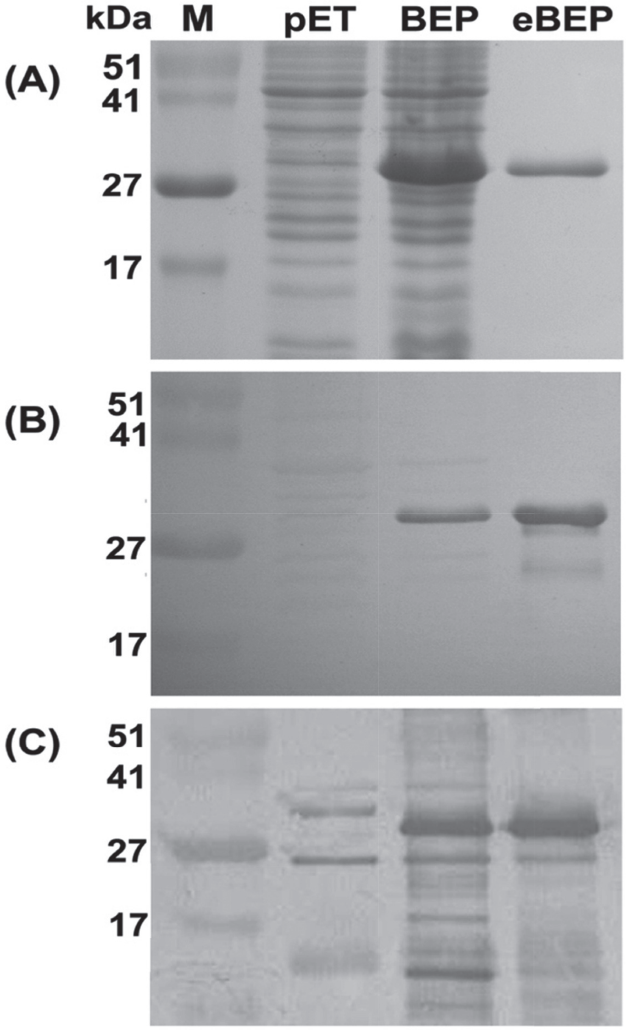



**圖 5.** 應用細菌大量表現的 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) CB 分離株融合性表現蛋白之 SDS-PAGE 電泳及西方墨點法分析。(A) GSMV-CB 融合性表現蛋白 (31.6 kDa) 之 SDS-PAGE 蛋白質電泳圖。受測樣品分別與 (B) Agdia 公司出品之 *Potyvirus* 單株抗體和 (C) 自製之 GSMV-CB 多元抗體進行西方墨點法分析。行 M：蛋白質分子量標幟；行 pET：細菌表現之 pET28b(+) 蛋白 (未帶有病毒鞘蛋白)；行 BEP：細菌表現之病毒鞘蛋白；行 eBEP：純化後之細菌表現的病毒鞘蛋白。

**Fig. 5.** Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting assays of the bacterial-expressed coat protein (CP) of *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV)-CB. (A) A 31.6-kDa bacterial-expressed fusion protein of GSMV-CB was observed in the SDS-PAGE assay. The tested samples were reacted with (B) the purchased monoclonal antibody of *Potyvirus* from Agdia, and (C) the polyclonal antibody of GSMV-CB prepared in this study. Lane M: protein markers; lane pET: IPTG-induced bacterial cell lysate containing the expression vector pET28b(+) without GSMV-CP insert; lane BEP: IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28b(+) with GSMV-CP insert; and lane eBEP: the purified bacterial-expressed GSMV-CP.

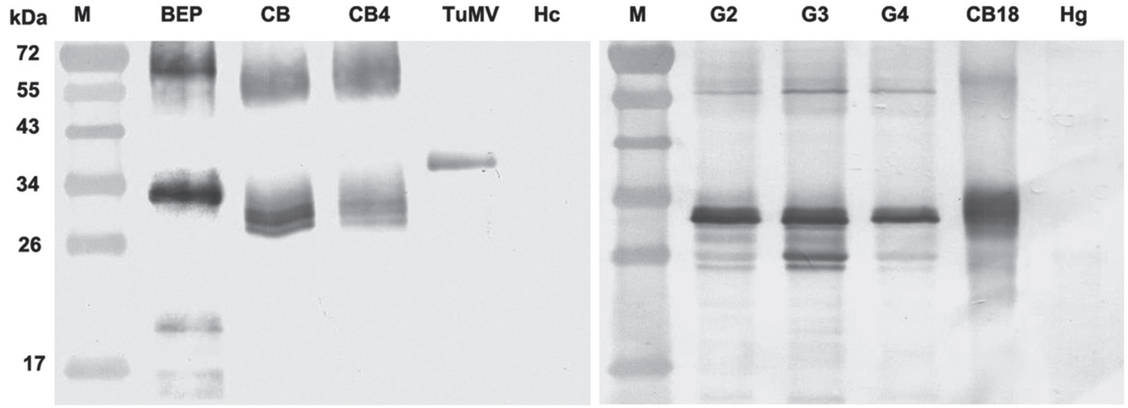



**圖 6.** 以西方墨點法應用 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) CB 多元抗體檢測宮燈百合和火焰百合之病毒發生。行 M：蛋白質分子量標幟；行 BEP：細菌表現之 CB 鞘蛋白；行 CB、CB4 和 CB18：宮燈百合 GSMV 罹病組織；行 G2、G3 和 G4：火焰百合 GSMV 罹病組織；行 Hc：健康宮燈百合；行 Hg：健康火焰百合。

**Fig. 6.** Western blotting for the detection of *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV)-infected tissues of Christmas bells and gloriosa, using the antiserum against the polyclonal antibody of GSMV-CB. Lane M: protein marker; lane BEP, IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28b(+) with GSMV-CP insert; lanes CB, CB4 and CB18: isolates of diseased Christmas bells; lanes G2, G3 and G4: isolates of diseased gloriosa; and lanes Hc and Hg: healthy tissues of Christmas bells and gloriosa.

果顯示自製之 CB 多元抗體於上述兩種免疫檢測中，可成功檢測到同源抗原 GSMV，但也會與 TuMV 產生非專一性反應。

## 討論

本研究乃以核酸分子生物學和血清學免疫法鑑定之結果，首次由宮燈百合上檢出 GSMV，確認罹病組織中有 GSMV 的發生；並首度完成宮燈百合 GSMV-CB 全長度核酸分子定序登錄，完成其多元抗體製備而實用於對 GSMV 的檢測。宮燈百合病毒種類除以往已有紀錄的 CMV 外，由本研究之鑑定結果證明也包括了文獻中所記錄發生於火焰百合上的 GSMV。

血清學為鑑定 *Potyvirus* 屬病毒的分類方法之一 (Moghal & Francki 1976)，惟病毒多元抗體於血清反應中容易有非專一性的結果 (Shepard *et al*. 1974; Shukla *et al*. 1989; Jordan & Hammond 1991)。除了以血清學分類的方式外，近年來兼採用核酸序列比對做分類依據，則可獲得較穩定而正確的鑑定結果 (Ward *et al*. 1992; Adams 2005; Gibbs & Oshima 2010)。

本研究以火焰百合 GSMV (EU042761) (Pham *et al*. 2011) 為主所做的 CP 胺基酸相同度分析，其與本研究的 3 個火焰百合分離株以及 GenBank 上已登錄的不同火焰百合來源的 GSMV 分離株相同度介於 86.5–90.6% 之間；但若以本研究的宮燈百合 GSMV-CB 為主，和其他火焰百合分離株相同度均高於 91% (結果未出示)。因此，以宮燈百合分離株做為與火焰百合 GSMV 比對之基礎，或許可有較高的胺基酸相同度可佐以鑑定 GSMV 成員。

本研究同時由不同宮燈百合及火焰百合上獲得不同的 GSMV 分離株，由病毒 CP 核酸序列顯示，此兩種寄主來源之 GSMV 分離株間有高於 91% 以上的相同度，且可於 CP 類緣分析上進一步佐證其他台灣學者已於 GenBank 登錄之火焰百合嵌紋病毒 GLMV (GenBank Acc. no. EU250360)，實屬 GSMV 之成員 (Pham *et al*. 2011)。此外，由本研究的 GSMV CP 類緣分析得知，同屬於宮燈百合來源的 GSMV 親緣關係較相近，然而與火焰百合分離株者為 GSMV 的不同分群，推測 GSMV 可能因不同寄主來源或地理分布而有演化分類上的差異；此種影響類緣關係有差異的原因，也見諸於其他種 potyvirus

病毒 (Ohshima *et al*. 2002; Tomimura *et al*. 2003; Gibbs & Ohshima 2010)。

由胺基酸序列比對 (alignment) 結果顯示，來自宮燈百合的 GSMV 分離株與荷蘭學者發表的火焰百合分離株 (EF042761) (Pham *et al*. 2011)，於第 20、22、 42、61 和 91 位址的胺基酸種類相同，但與大部分的火焰百合 GSMV 分離株有差異，推斷此火焰百合分離株 (EF042761) 與宮燈百合分離株者居於相同的分類群，可能與此等位置之胺基酸種類相同有關，但仍需有更多分離株加以分析印證。

本研究以細菌生合成系統所製備的 GSMV-CB 多元抗體，於 indirect ELISA 和西方墨點法中，均可與其同源抗原 BEPCB 表現蛋白、宮燈百合和火焰百合罹病組織產生正反應，顯示此多元抗體，可應用在此兩種花卉上對 GSMV 的免疫檢測與鑑定。本研究也發現 GSMV-CB 多元抗體可與同屬於 *Potyvirus* 的 TuMV 反應；然而，於 indirect ELISA 中雖可與 TuMV 產生高於 1.0 之正反應讀值，但於西方墨點法中可依病毒分子量大小而區分出此兩種不同病毒；且另於 RT-PCR 法中，可用本研究所設計的 3 組 GSMV 引子對並不與 TuMV 產生 3 種預估核酸片段 (715、660 或 500 bp) 之條帶而加以區分 (結果未出示)。綜合上述結果顯示，本研究所製備之 GSMV-CB 多元抗體在兩種免疫檢測中，雖不具有對 GSMV 的檢測專一性，但可藉由西方墨點法依病毒 CP 分子量大小，或由 RT-PCR 法依增幅核酸片段的分子量大小，做不同 potyvirus 的鑑別性檢測。尤其本研究所設計的 GSMV715u/GSMVd 僅可檢測到宮燈百合 GSMV 分離株，再搭配其他 2 組引子可同時檢出不同寄主來源的 GSMV，可應用此 3 組引子對以 RT-PCR 法就宮燈百合和火焰百合 GSMV 分離株進行快速鑑別檢測。

本研究由兩種寄主來源之 GSMV 分離株，其 CP 核酸序列相互間雖有高於 91% 以上的相同度，仍可藉由 GSMV715u/GSMVd 於 52℃、煉合 40 s 的條件下達到僅檢測到宮燈百合 GSMV 分離株的鑑別效果。推測乃因依據宮燈百合 CB 的 CP 核苷酸序列所設計的上游引子 (GSM-V715u) 序列，乃位於 CP 的 N 端對應第 12–29 個核甘酸，其與火焰百合分離株相對應的核苷酸位址處有 22.2% (4/18) 的歧異度所致。*Potyvirus* 屬病毒 CP 的 N 端為歧異度高的區域 (Shukla & Ward 1989)，藉由此區域設計引子而達到區分同種病毒的不同分離株系統，也有見諸於其他的 potyvirus 病毒研究 (Langeveld *et al*. 1991; Colinet *et al*. 1994)。

*Potyvirus* 屬病毒 CP 的 N 端高度歧異的區域，其胺基酸序列可作為種間之鑑別依據，而 CP N 端主要裸露於病毒顆粒表面，為病毒專一性的抗原決定基 (epitopes) 所在 (Shukla *et al*. 1988, 1989)。病毒多元抗體使用於血清免疫法反應中容易有非專一性的結果，乃因裸露於病毒顆粒表面的抗原決定基會因病毒純化或保存時而裂解，導致抗原性的流失 (Shukla *et al*. 1988)。尤其以全長度 CP 為抗原所製備出的多元抗體，更容易導致對特定病毒的非專一性免疫檢測結果 (Shepard *et al*. 1974; Shukla *et al*. 1989)。本研究乃採用細菌表現的 GSMV 全長度 CP 所表現的融合性蛋白，加上經過蛋白質純化後，本質上已不具有完整的病毒 CP 結構體而僅有蛋白質產物，以表現蛋白為抗原所免疫對應產生的多元抗體，對 GSMV 不具有檢測專一性，也因而能檢測到其他病毒如 TuMV。為解決 *Potyvirus* 屬病毒多元抗體常見的非專一性特性，有學者採用利用單株抗體 (Jordan & Hammond 1991) 或是 CP N 端的肽鏈作為抗原而製備出可鑑別 “種” 的抗體 (Shukla *et al*. 1989; Bhat *et al*. 1999)。

多元抗體藉由「抗原-抗體」的原理，在免疫檢測上有一定的專一性 (Astier *et al*. 2007)，但也會因抗原免疫過程中，因為所對應同一分子的不同抗原決定基 (antigenic determinants) 而產生非專一性反應的結果 (Souiri *et al*. 2014)；而單株抗體來自於對應單一而專一的抗原決定基，則可提供特定專一的鑑別檢測 (van den Heuvel *et al*. 1990; Wu *et al*. 2014)。然而，在診斷鑑定上，仍可藉由單株 (Liu *et al*. 2015) 或多元抗體 (Shukla & Ward 1989) 對不同病毒的非專一性檢測效果，在特定需求上獲得廣效性的病毒檢出。本研究所製備之 GSMV-CB 多元抗體具有對特定 *Potyvirus* 屬病毒 (如 TuMV) 的非專一性檢出效果，可能也具有檢出其他 *Potyvirus* 屬病毒的

潛力，而能增加本多元抗體之廣效性檢測應用，其廣效性檢測的對象，則需有更多來源的 potyvirus 病毒加以佐證。

本研究所製備之 GSMV-CB 多元抗體於西方墨點法中，可檢測出來自宮燈百合和火焰百合罹病組織中之 GSMV，然而呈色結果均可見有其他低分子量之蛋白條帶，推測此可能與系統性感染組織中之病毒 CP 遭到裂解有關 (Larsen *et al*. 1996)，或可能因罹病組織在冷凍保存過程中會有加速蛋白的裂解作用 (Hiebert & McDonald 1973; Bhatnagar *et al*. 2007)。此種 CP 裂解現象在 *Potyvirus* 屬病毒如 TuMV (Hiebert & McDonald 1973)；*Carlavirus* 屬病毒包括 *Kalanchoe latent virus* (Hearon 1984; Dinesen *et al*. 2009)、*Red clover vein mosaic virus* (Larsen *et al*. 1996) 和 *Nerine latent virus* (Chen *et al*. 2016)，以及 *Tobacco rattle virus* (Mayo & Cooper 1973) 均有類似現象。

本研究所製備之宮燈百合 GSMV 抗血清，可實用於 indirect ELISA 和西方墨點法等免疫法檢測，能有效地檢測到此病毒。相關病毒分離株的核酸序列資料和檢測試劑將可做為此等病毒之鑑定比對依據，有助於國內對於進口宮燈百合或火焰百合 GSMV 的發生監測與其生態的瞭解，裨益實務性的檢測應用性以瞭解此病毒在台灣危害之可能風險。

## 誌謝

本試驗承本組病毒研究室助理莊喻婷小姐協助核酸檢測試驗、台灣大學植物病理與微生物學系高達瑋同學協助核酸檢測分析及選殖試驗。謹此一併致謝。

## 引用文獻

Adams, M. J., J. F. Antoniw, and C. M. Fauquet. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. Arch. Virol. 150:459–479.

Astier, S., J. Albouy, Y. Maury, C. Robaglia, and H. Lecoq. 2007. Principles of Plant Virology: Genome, Pathogenicity, Virus Ecology. Science Publishers. Enfield, NH. 472 pp.

Atreya, P. L., C. D. Atreya, and T. P. Pirone. 1991. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:7887–7891.

Araki, M., S. Yamashita, Y. Doi, and K. Yora. 1985. Three viruses from gloriosa (*Gloriosa rothschildiana* O'brien); *Gloriosa fleck virus, Gloriosa stripe mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus*. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 51:632–636. (in Japanese with English abstract)

Bhat, A. I., A. Varma, H. R. Pappu, M. Rajamannar, R. K. Jain, and S. Praveen. 1999. Characterization of a potyvirus from eggplant (*Solanum melongena*) as a strain of potato virus Y by N-terminal serology and sequence relationships. Plant Pathol. 48:648–654.

Bhatnagar, B. S., R. H. Bogner, and M. J. Pikal. 2007. Protein stability during freezing: Separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. Pharm. Dev. Technol. 12:505–523.

Chang, C. A., E. Hiebert, and D. E. Purcifull. 1988. Purification, characterization, and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyviruses. Phytopathology 78:1266–1275.

Chen, C. C., C. A. Chang, and F. L. Chiang. 2016. Serological and molecular identification of *Nerine latent virus* infecting blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn). J. Taiwan. Agric. Res. 65:194–206. (in Chinese with English abstract)

Chen, C. C. and F. L. Chiang. 2017. Development and application of the molecular and serological detection methods for *Cymbidium ringspot virus*. J. Taiwan Agric. Res. 66:202–218. (in Chinese with English Abstract)

Chen, C. C., H. T. Hsu, Y. H. Cheng, C. H. Huang, J. Y. Liao, H. T. Tsai, and C. A. Chang. 2006. Molecular and serological characterization of a distinct potyvirus causing latent infection in calla lilies. Bot. Stud. 47:369–378.

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475–483.

Colinet, D., J. Kummert, P. Lepoivre, and J. Semal. 1994. Identification of distinct potyviruses in mixedly-infected sweet potato by the polymerase chain reaction with degenerate primers. Phytopathology 84:65–69.

Dinesen, M., M. Lundmark, and M. Albrechtsen. 2009. Complete genome sequences of two isolates of *Kalanchoë latent virus*. Arch. Virol. 154:1173–1175.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783–

791.

Frenkel, M. J., C. W. Ward, and D. D. Shukla. 1989. The use of 3’ non-coding nucleotide sequences in the taxonomy of potyviruses: Application to Watermelon mosaic virus 2 and Soybean mosaic virus-N. J. Gen. Virol. 70:2775–2783.

Gibbs, A. and K. Ohshima. 2010. Potyviruses and the digital revolution. Annu. Rev. Phytopathol. 48:205–223.

Hearon, S. S. 1984. Comparison of two strains of *Kalanchoe latent virus*, *Carlavirus* group. Phytopathology 74:670–676.

Hiebert, E. and J. G. McDonald. 1973. Characterization of some proteins associated with viruses in the potato Y group. Virology 56:349−361.

Jordan, R. and J. Hammond. 1991. Comparison and differentiation of potyvirus isolates and identification of strain-, virus-, subgroup-specific and potyvirus group-common epitopes using monoclonal antibodies. J. Gen. Virol. 72:25–36.

Koenig, R. and D. Lesemann. 1974. A potyvirus from *Gloriosa rothschildiana*. Phytopath. Z. 80:136–142.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685.

Langeveld, S. A., J. M. Dore, J. Memelink, A. F. L. M. Derks, C. I. M. van der Vlugt, C. J. Asjes, and J. F. Bol. 1991. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. J. Gen. Virol. 72:1531–1541.

Larsen, R. C., W. J. Kaiser, and S. D. Wyatt. 1996. First report of a virus disease of chickpea caused by a strain of Red clover vein mosaic carlavirus. Plant Dis. 80:709.

Li, R. H., F. W. Zettler, D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 1998. The nucleotide sequence of the 3’-terminal region of Dasheen mosaic virus (Caladium isolate) and expression of its coat protein in *Escherichia coli* for antiserum production. Arch. Virol. 143:2461–2469.

Liu, H. L, W. F. Lin, W. C. Hu, Y. A. Lee, and Y. C. Chang. 2015. A strategy for generating a broad-spectrum monoclonal antibody and soluble single-chain variable fragments against plant potyviruses. Appl. Environ. Microbiol. 81:6839–6849.

Mayo, M. A. and J. I. Cooper. 1973. Partial degradation of the protein in *Tobacco rattle virus* during storage. J. Gen. Virol. 18:281–289.

Moghal, S. M. and R. I. B. Francki. 1976. Towards a system for the identification and classification of potyviruses. I. Serology and amino acid composition of six distinct viruses. Virology 73:350–362.

Mollov, D., S. Grinstead, M. N. Tahir, M. Reinsel, and J. Hammond. 2017. First report of multiple isolates of *Gloriosa stripe mosaic virus* in *Gloriosa superba* in the United States. Plant Dis. 101:1070.

Ohshima, K., Y. Yamaguchi, R. Hirota, T. Hamamoto, K. Tomimura, Z. Tan, T. Sano, F. Azuhata, J. A. Walsh, J. Fletcher, J. Chen, A. Gera, and A. Gibbs. 2002. Molecular evolution of Turnip mosaic virus: Evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. J. Gen. Virol. 83:1511–1521.

Pappu, S. S., H. R. Pappu, C. A. Chang, A. K. Culbreath, and J. W. Todd. 1998. Differentiation of biologically distinct peanut stripe potyvirus strains by a nucleotide polymorphism-based assay. Plant Dis. 82:1121–1125.

Pham, K. T. K., M. J. D. de Kock, M. E. C. Lemmers, and A. F. L. M. Derks. 2011. Molecular identification of potyviruses infecting bulbous ornamentals by the analysis of coat protein (CP) sequences. Acta Hortic. 901:167–172.

Shiota, A. and S. Uematsu. 1998. *Cucumber mosaic virus* isolated from *Sandersonia aurantiaca* Hook. Proc. Kanto Tosan Pl. Protect. Soc. 45:99–100.

Shukla, D. D., J. Jilka, M. Tosic, and R. E. Ford. 1989. A novel approach to the serology of potyviruses involving affinity-purified polyclonal antibodies directed towards virus-specific N termini of coat proteins. J. Gen. Virol.70:13–23.

Shukla, D. D., P. M. Strike, S. L. Tracy, K. H. Gough, and C. W. Ward. 1988. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. J. Gen. Virol. 69:1497–1508.

Shukla, D. D. and C. W. Ward. 1989. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. Arch. Virol. 106:171–200.

Shepard, J. F., G. A. Secor, and D. E. Purcifull. 1974. Immunochemical cross-reactivity between the dissociated capsid proteins of PVY group plant viruses. Virology 58:464–475.

Souiri, A., M. Zemzami, S. Amzazi, and M. M. Ennaji. 2014. Polyclonal and monoclonal antibody-based methods for detection of plant viruses. Eur. J. Sci. Res. 123:281–295.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25:4876–4882.

Tomimura, K., A. J. Gibbs, C. E. Jenner, J. A. Walsh, and K. Ohshima. 2003. The phylogeny of *Turnip mosaic*

*virus*; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent 'emergence' in east Asia. Mol. Ecol. 12:2099–2111.

van den Heuvel, J. F. J. M., C. M. de Blank, R. W. Goldbach, and D. Peters. 1990. A characterization of epitopes on potato leafroll virus coat protein. Arch. Virol. 115:185–197.

Ward, C. W., N. M. McKern, M. J. Frenkel, and D. D. Shukla. 1992. Sequence data as the major criterion for potyvirus classification. Arch. Virol. Suppl. 5:283–297.

Wu, G. W., M. Tang, G. P. Wang, C. X. Wang, Y. Liu, F. Yang, and N. Hong. 2014. The epitope structure of *Citrus tristeza virus* coat protein mapped by recombinant proteins and monoclonal antibodies. Virology 448:238–246.

# Molecular and Serological Identification of *Gloriosa stripe mosaic virus* on Christmas Bells (*Sandersonia aurantiaca* Hook)

Chin-Chih Chen[1,*], Fen-Lang Chiang[2], and Chun-Huey Huang[2]

## Abstract

Chen, C. C., F. L. Chiang, and C. H. Huang. 2018. Molecular and serological identification of *Gloriosa stripe mosaic virus* on Christmas bells (*Sandersonia aurantiaca* Hook). J. Taiwan Agric. Res. 67(3):229–246.

A *Potyvirus* virus (isolate code CB) was detected from an imported bulb of Christmas bells (*Sandersonia aurantiaca* Hook), and further identified as the *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) based on the sequences of the coat protein (CP) coding region. The full-length genome sequence of CB was determined, revealing that the CB genome is 9,455 nucleotides (nt) long (accession number EF427894), encoding a polyprotein with 3,052 amino acids (aa). The fragment of 798 nt is coding for 266 aa of the CB CP. Moreover, the CP nt sequences of another five virus isolates, namely CB4 (KT764122) and CB18 (KT764123) from Christmas bells, and GL2 (KT764120), GL3 (KT764124), and GL4 (KT764121) from gloriosa, were also determined and shared 86.5–94.0% aa identities with that of the known GSMV-CP (EU042761) in GenBank, indicating that they are also GSMV isolates. The phylogenetic analysis indicated that the CB, CB4, and CB18 from Christmas bells are closely related. Three primers sets (upstream primers: GSMV7150u, GSMV660u and GSMV500u, and a common downstream primer: GSMVd) were designed from the CB-CP sequence for detection of GSMV. The primer pairs GSMV660u/GSMVd and GSMV500u/GSMVd were useful to amplify the expected amplicons from all of GSMV isolates from Christmas bells and gloriosa in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The primer pair GSMV715u/GSMVd can amplify the expected 715-bp fragment only from the GSMV isolates of Christmas bells, and is useful for distinguishing those GSMV isolates of Christmas bells from gloriosa's. The full-length nucleotides of the CB-CP were constructed to the expression vector pET28b, and transformed into *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) for induction of the overexpressed viral protein. Polyclonal antiserum against the CB-CP, prepared by immunizing the bacterial expressed fusion protein into a rabbit, positively reacted with the GSMV-CP in the virus-infected Christmas bells and gloriosa tissues in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blotting. In this report, GSMV was first found on Christmas bells, and its full-length genome sequence was first completed. The prepared GSMV primer pairs and polyclonal antiserum are helpful to strengthen our ability in GSMV inspection.

**Key words:** Christmas bells (*Sandersonia aurantiaca* Hook), *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV), Full-length sequence, RT-PCR detection, Polyclonal antibody.

---

Received: October 10, 2017; Accepted: November 28, 2017.
[*] Corresponding author, e-mail: chinzue@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(3):247–257 (2018)
DOI:10.6156/JTAR.201809_67(3).0002

研究報告

# 秋水仙素處理對藍紫色蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* 原球體多倍體誘導之影響

曹進義[1] 陳威臣[1] 吳容儀[2] 吳姿穎[3] 夏奇鈮[4,*]

## 摘要

曹進義、陳威臣、吳容儀、吳姿穎、夏奇鈮。2018。秋水仙素處理藍紫色蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* 原球體對多倍體誘導之影響。台灣農業研究 67(3):247–257。

本研究以藍紫色原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* 無菌播種發芽後約 6 wk 齡之原球體 (protocorm) 作為培植體，探討秋水仙素 (colchicine) 濃度及處理時間對多倍體誘導之影響，並以流式細胞儀與根尖染色檢測苗株之多倍性。結果顯示，在存活率方面，原球體在不同濃度與天數的秋水仙素處理下，以處理 1 d 存活率最高，達 85.5–93.3%，隨著秋水仙素處理天數的增加，存活率有降低的趨勢，且二因子間具有顯著交感效應。在多倍體的誘導方面，原球體以 0.1 mM 秋水仙素浸漬處理 1 d 即可誘導出多倍體，隨著處理天數的增加，多倍體的誘導率亦隨之提高，處理 8 d 之多倍體誘導率可達 43.9%，此誘導率與 2.5 mM 秋水仙素處理原球體 8 d 多倍體誘導率 46.0% 相較並無顯著差異，但前者可獲得生長良好且數量較多的多倍體植株。比較 2 倍體與秋水仙素誘導所得之 4 倍體植株的園藝性狀，結果顯示 4 倍體植株具有較大的花徑、果莢、梗徑與子房徑，且葉片較寬短、花梗長度較短以及花朵質地較厚實堅挺等特性。有關 4 倍體之雜交親和性尚需進一步測試。

**關鍵詞**：蝴蝶蘭、原球體、秋水仙素、倍體數、流式細胞儀。

## 前言

蝴蝶蘭為國際花卉市場上最受歡迎的蘭花之一 (Wang 2004)，台灣在蝴蝶蘭種原上具有優勢，多年來藉由雜交育種與組織培養繁殖技術培育出各種色系的蝴蝶蘭品種，但仍有難以突破的瓶頸，譬如缺乏新穎的特定花色，藍紫色系之蝴蝶蘭即為其一 (Tsao 2013)。藍紫色花為開花植物中的夢幻顏色，亦為育種者亟欲育成之目標 (Griesbach 2005)，考察目前商業生產的蝴蝶蘭品種中，鮮少有藍紫色蝴蝶蘭品種同時具備有商業生產模式所需的特性。Arends (1970) 在原生種蝴蝶蘭染色體型態的分析研究指出，*Phalaenopsis bellina*、*Phalaenopsis* violacea 及 *Phalaenopsis pulcherrima* 等原種具有大型染色體，*Phalaenopsis equestris* 則為小型染色體，且在分類上 *P. bellina*、*P.* violacea 屬於 *Polychilos* 亞屬，*P. pulcherrima* 與 *P. equestris* 屬於 *Phalaenopsis* 亞屬但不同節 (Christenson 2001)。上述種原皆具有藍紫色之變種植株，但此類藍紫色蝴蝶蘭的種間或亞屬間雜交難度較一般蝴蝶蘭雜交育種為高，雜交不親和性的現象亦相當普遍。由於現有藍紫色蝴蝶蘭的親本大多是原種或是原種第一代雜交種，且皆為 2 倍體植株，具花徑較小、花朵質地較薄、整體花形較差且花朵壽命較短等缺點；反觀目前商業生產之蝴

投稿日期：2017 年 8 月 15 日；接受日期：2017 年 12 月 17 日。
* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所花卉研究中心助理研究員。台灣 雲林縣。
[3] 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

蝶蘭品種大多為 4 倍體，二者之間雜交可能面臨雜交親和性低的問題，即使育有雜交後代也可能多為 3 倍體，難以更進一步之利用 (Chen *et al*. 2009)。

根據 Griesbach (1985) 的研究顯示，以秋水仙素 (colchicine) 誘導 2 倍體的原生種蝴蝶蘭，或雜交種所獲得的 4 倍體蝴蝶蘭來進行雜交育種，可改善雜交不親和性與園藝性狀等問題。多倍體主要是指相對正常染色體 (2n = 2x) 數目倍加之植株，多倍體具有的特徵為增大的植物的器官 (Osborn *et al*. 2003)；花徑增大及改善花朵質地與花型 (Griesbach 1981)；葉數與根數減少，根較粗短，生長較為緩慢 (Azmi *et al*. 2016) 以及可克服雜交不親和性 (Griesbach 1985; Adaniya & Shirai 2001) 等特性。由於自然界自發性的染色體倍加頻率非常低且難以被發現，因此藉由人為的方式進行多倍體化誘導，獲得多倍體的育種材料有其必要性 (Griesbach 1981)。秋水仙素為染色體倍加常用的藥劑 (Hsia *et al*. 2010)，在蝴蝶蘭與其他蘭科植物的多倍體誘導上已有許多成功之案例 (Griesbach 1981, 1985; Hsia *et al*. 2009, 2010; Azmi *et al*. 2016)。本研究以藍紫色蝴蝶蘭原生種 *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* 之原球體為材料，探討秋水仙素濃度與處理天數對於多倍體化誘導之影響，預期可誘導出多倍體植株作為育種親本，藉此擴大種原的利用性，並加速雜交後代育成為商業品種，解決目前藍紫色蝴蝶蘭雜交育種所面臨之困境。

# 材料與方法

## 無菌播種

藍紫色原生種蝴蝶蘭 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 自花授粉 120 d 後之果莢，以 75% 酒精表面擦拭消毒，再以 0.6% (v/v) NaOCl (Clorox Bleach, Oakland, CA, USA) 添加 1–2 滴 Tween 20 搖動消毒 20 min (含超音波震盪 1 min)，然後於無菌操作台內以無菌水清洗 3 次後切開果莢，將種子均勻接種在固體培養基上並置於培養室培養。培養室培養環境為溫度 25℃ ± 1℃，光照強度為 38 μM $m^{-2}$ $s^{-1}$ 及 14 h 光週期。固體培養基以花寶 1 號 (HYPONeX No. 1. N : P : K = 7 : 6 : 19) 為基本鹽類，添加 2 g $L^{-1}$ 花寶 1 號、1 g $L^{-1}$ Peptone、1% 蔗糖、2 g $L^{-1}$ 活性碳、25 g $L^{-1}$ 香蕉、50 g $L^{-1}$ 馬鈴薯及 8 g $L^{-1}$ Bacto Agar (Difco, Sparks, MD, USA)。固體培養容器為直徑 90 mm、高度 15 mm 的培養皿，每皿置 25 mL 培養基。秋水仙素浸漬處理之液體培養基，同樣以花寶 1 號為基本鹽類，並添加 1 g $L^{-1}$ Peptone、1% 蔗糖，培養容器為 125 mL 三角玻璃瓶，每玻璃瓶置 20 mL 培養液，pH 皆調整至 5.6，再以 121℃滅菌 20 min。

## 秋水仙素處理試驗

秋水仙素母液以 0.22 μm 微過濾膜過濾至已滅菌之血清瓶容器，並以鋁箔紙包覆避光，放置 4℃冰箱冷藏備用。以播種後 6 wk、大小約 1.5 mm 之原球體 (protocorm) 為培植體，原球體直接接種至固體培養基作為對照組。處理組之原球體經刻傷處理 (以解剖刀切割原球體邊緣一刀) 後，分別置入添加 0.1、0.5 及 2.5 mM 秋水仙素之培養液中，處理時間分別為 1、2、4 及 8 d。原球體在處理期間於避光環境下以 50 rpm 轉速進行震盪培養 (Griesbach 1981)；浸漬處理後之原球體以無菌水清洗 3 次，並接種於不含秋水仙素之前述花寶 1 號固體培養基中。每個處理 3 重覆，每重覆接種 50 個原球體，並於接種後 4 wk 調查存活率。

## 染色體之倍體數分析

參考 Hsia *et al*. (2010) 的分析方法，切取培植體長出大小約 0.3–0.5 $cm^2$ 幼嫩葉片，加入 0.2 mL UV CyStain Precise T 萃取緩衝液 A (Partec, Münster, Germany)，以刀片將葉片組織切碎後過濾，再於濾液中添加 0.8 mL Partec Cystain Precise T 緩衝液 B，靜置染色 3 min 後以流式細胞儀 (Partec, Münster, Germany) 檢測，每個處理逢機檢測 33 個培植體樣品，檢測時以高雄大學所提供經檢測分析為 2 倍體之原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis aphdodite* 瓶苗為對照材料。每個培植體取樣 2 次，每一樣品檢測之細胞數為 5,000 個。

## 根尖染色體染色分析

於中午 11:30–12:30 間，切取經流式細胞儀檢測為 2 倍體 (對照組) 與多倍體之藍紫色原生種蝴蝶蘭 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 瓶苗

植株之根尖做為染色體分析材料。參考 Kuo *et al*. (2005) 所建立之蝴蝶蘭根尖染色技術並稍作修正，取幼嫩根尖浸於 2 mM 8-HQ (8-hydroxyquioline) 於黑暗環境下處理 3–4 h，以無菌水清洗 3 次，之後以 Farmar's solution (95% alcohol : acetic acid = 3 : 1) (新鮮配製) 固定液浸泡 24–48 h，接著用無菌水清洗，之後置入 70% 酒精並放置於 4℃冰箱中保存備用。觀察時先以無菌水將樣品清洗數次後，置於酵素溶液中 (6% pectinase 及 6% cellulose溶於 75 mM KCl，pH 4)，於 37℃下作用 1 h 後，取出以無菌水清洗數次。然後夾取適量經酵素軟化後的根尖置於載玻片上，加入 lacto-propionic-orcein 染劑，輕壓使染色體均勻分布後，夾出不要的組織碎片，蓋上蓋玻片染色數分鐘後，於酒精燈上迅速過火使細胞膨大，以手掌壓片後，於光學顯微鏡下觀察並照相記錄。

### 園藝性狀調查

將 2 倍體與秋水仙素誘導所得之多倍體苗株出瓶栽培於農業試驗所生技組配備有水牆風扇之溫室約 60 wk 後，取同時間第一次開花之 2 倍體與 4 倍體植株各 7 株，進行花朵橫徑、梗長 (不含花序長)、梗徑 (第 3 節位)、最大葉長、葉寬、子房長 (含子房柄)、子房寬 (最寬)、授粉後 12 wk 之果莢長、果莢寬等園藝性狀調查。

### 統計分析

試驗採用完全逢機設計 (completely randomized design; CRD)，試驗資料先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，若處理間差異顯著，再進行最小顯著差異性測驗 (least significant difference; LSD) 比較各處理平均值間之差異性。其中，培植體存活率與多倍體率資料，在進行上述統計分析之前先經 $\sin^{-1}$ 角度轉換。本研究各項分析工作係利用 SAS 統計分析套裝軟體進行。

## 結果

### 秋水仙素濃度配合浸漬時間處理影響原球體存活率

將藍紫色原生種蝴蝶蘭 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 之原球體作為培植體，以 3 種不同秋水仙素濃度 (0.1、0.5 及 2.5 mM) 與 4 種浸漬處理時間 (1、2、4、8 d) 進行多倍體誘導之結果顯示，原球體在不同濃度與天數的秋水仙素處理下，以處理 1 d 原球體有最高的存活率，達 85.5–93.3%。隨秋水仙素處理天數的增加，培植體存活率呈現下降的趨勢，且處理濃度與天數二因子間呈現顯著之交感效應，顯示秋水仙素濃度與處理時間的長短的交互作用會影響原球體的存活率 (表 1)。

### 以流式細胞儀及根尖染色之苗株倍體數分析

在多倍體誘導效果方面，以 0.1 mM 秋水仙素處理 1 d 即可誘導出多倍體 (4 倍體)，但其多倍體誘導率僅為 1%。隨著秋水仙素處理濃度與天數的增加，多倍體的比率亦隨之提升，其中以 0.1、0.5 及 2.5 mM 處理 8 d 有較高的多倍體 (3x、4x、6x、8x) 誘導率，為 39–46%。在不同倍體的誘導率方面，以 4 倍體所占比率最高，為 33–40%。在秋水仙素濃度與處理天數二個因子中，以濃度為主要影響因子，呈現顯著 (6x 及 8x) 與極顯著差異 (4x) (表 1)。觀察亦發現，以 0.1 mM 秋水仙素處理 8 d 後，原球體後續之生長與分化受到抑制，隨著處理濃度與天數的增加 (0.5 mM 及 2.5 mM 秋水仙素處理 8 d)，原球體生長與分化受抑制的情形更為明顯，且植株分化與生長更加緩慢 (圖 1)。根據流式細胞儀檢測各種倍體數苗株之圖譜 (圖 2) 與根尖染色體分析的結果 (圖 3)，顯示以流式細胞儀分析檢測苗株之葉片及切取根尖，進行染色體分析兩者所得的結果是相符合的。

### 園藝性狀調查

由於誘導所得之 3 倍體、6 倍體與 8 倍體植株較少，僅為 2% 左右，加上瓶內培養及取樣過程與栽培期間皆有部分材料死亡，得以正常生長並開花結莢之多倍體目前僅有 4 倍體植株。觀察並比較 4 倍體藍紫色原生種蝴蝶蘭 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 植株與對照組 (2 倍體) 植株之園藝性狀，顯示前者具有較大的花徑與果莢、梗徑與子房徑較粗，以及葉片寬短、花梗長度較短以及花朵質地厚實堅挺等特性，外觀

**表 1.** 秋水仙素濃度與天數處理對藍紫色原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* 原球體與誘導多倍體之影響。

**Table 1.** Effects of colchicine concentration and exposure duration on polyploidy induction of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* protocorm explants[z].

| Colchicine (mM) | Exposure duration (d) | Survival rate (%)[y] | Ploidy (%)[x] | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 2x | 3x | 4x | 6x | 8x |
| Control (0) | 0 | 93.2 ± 5.0 a[w] | 100.0 ± 0.0 a | 0.0 ± 0.0 a | 0.0 ± 0.0 e | 0.0 ± 0.0 b | 0.0 ± 0.0 b |
| 0.1 | 1 | 85.5 ± 0.8 abc | 99.0 ± 1.0 a | 0.0 ± 0.0 a | 1.0 ± 1.0 e | 0.0 ± 0.0 b | 0.0 ± 0.0 b |
| | 2 | 71.1 ± 2.2 cd | 98.0 ± 1.9 a | 0.0 ± 0.0 a | 2.0 ± 2.0 e | 0.0 ± 0.0 b | 0.0 ± 0.0 b |
| | 4 | 78.7 ± 2.8 bcd | 89.0 ± 2.1 ab | 1.0 ± 1.0 a | 10.0 ± 2.7 de | 0.0 ± 0.0 b | 0.0 ± 0.0 b |
| | 8 | 69.6 ± 7.0 d | 56.1 ± 5.3 de | 0.0 ± 0.0 a | 40.0 ± 4.0 a | 0.0 ± 0.0 b | 3.9 ± 2.0 a |
| 0.5 | 1 | 93.3 ± 5.1 a | 91.1 ± 6.1 ab | 0.0 ± 0.0 a | 8.9 ± 6.1 de | 0.0 ± 0.0 b | 0.0 ± 0.0 b |
| | 2 | 76.6 ± 5.7 bcd | 88.2 ± 7.8 abc | 0.0 ± 0.0 a | 8.9 ± 6.1 de | 0.0 ± 0.0 b | 2.9 ± 1.7 ab |
| | 4 | 74.4 ± 5.8 cd | 73.0 ± 8.1 cd | 0.0 ± 0.0 a | 26.0 ± 7.0 bc | 0.0 ± 0.0 b | 1.0 ± 1.0 ab |
| | 8 | 70.0 ± 5.0 d | 61.0 ± 10.5 de | 2.0 ± 2.0 a | 33.0 ± 5.9 ab | 2.0 ± 2.0 a | 2.0 ± 2.0 ab |
| 2.5 | 1 | 89.3 ± 3.8 a | 96.0 ± 3.9 ab | 2.0 ± 2.0 a | 2.0 ± 2.0 e | 0.0 ± 0.0 b | 0.0 ± 0.0 b |
| | 2 | 67.7 ± 4.8 d | 91.0 ± 1.7 ab | 1.0 ± 1.0 a | 8.0 ± 1.0 de | 0.0 ± 0.0 b | 0.0 ± 0.0 b |
| | 4 | 70.1 ± 9.1 d | 82.0 ± 1.9 bc | 0.0 ± 0.0 a | 18.0 ± 1.9 cd | 0.0 ± 0.0 b | 0.0 ± 0.0 b |
| | 8 | 72.5 ± 0.5 cd | 54.0 ± 3.3 e | 0.0 ± 0.0 a | 40.0 ± 3.4 a | 2.0 ± 1.0 a | 4.0 ± 1.0 a |
| Concentration | | NS[v] | ** | NS | ** | * | * |
| Days | | * | * | NS | NS | NS | NS |
| Concentration × Days | | * | NS | NS | NS | NS | NS |

[z] Explants were cultured on HYPONeX No. 1. (N : P : K = 7 : 6 : 19) medium which contains 2 g $L^{-1}$ HYPONeX No. 1, 1 g $L^{-1}$ Peptone, 1% sucrose, 2 g $L^{-1}$ charcoal, 25 g $L^{-1}$ banana, 50 g $L^{-1}$ potato, and 8 g $L^{-1}$ bacto agar after exposure with various colchicine concentrations for various days in a liquid medium. Liquid medium is the same as the HYPONeX No. 1. medium which contains 2 g $L^{-1}$ HYPONeX No. 1, 1 g $L^{-1}$ Peptone, and 1% sucrose. Each treatment had 3 replications with 50 protocorm explants per replication.
[y] Percentage of survival rate = (no. of green and protocorms/50) × 100%.
[x] Percentage of ploidy = (no. of ploidy explants/33 survival explants) × 100%.
[w] Means in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.
[v] NS, *, **: Non-significant, significant at 0.05, and 0.01 levels, respectively.

大小與 2 倍體植株間呈現顯著差異 (表 2、圖 4)。不同倍數體植株生長速率與對照組相較之下生長較為緩慢，於原球體生長與分化階段即可觀察出對其生長有影響，尤以高濃度 (0.5 mM 及 2.5 mM) 與多天數 (8 d) 處理最為明顯。相對的，亦影響後續苗株之生長速度，生長最為緩慢，而 6 倍體與 8 倍體培植體不易分化長成正常苗株，出瓶種植後容易死亡。

## 討論

由於現行藍紫色蝴蝶蘭育種所使用之親本大多為種原歧異度大之 2 倍體原生種 (Arends 1970; Christenson 2001)，或是親本為園藝性狀不佳之種間雜交種，期待與目前大白花商業品種 (大多為 4 倍體) 進行雜交，此種雜交可能面臨雜交親和性低的問題，即使幸運獲得雜交後代，也可能多為 3 倍體，難以有更進一步之雜交應用 (Chen *et al*. 2009)。在我們實際進行超過 200 個以上雜交組合之育種過程中，亦觀察到藍紫色蝴蝶蘭與商業品種之雜交後代，如欲以父母本或以其他藍紫色蝴蝶蘭種原進行回交或雜交時，往往無法成功獲得果莢，因此難有更進一步之育種應用。據此，本研究欲藉由 2 倍體之藍紫色蝴蝶蘭育種材料的多倍體化，作為克服雜交不親和性以及改善花徑、花形、花朵質地與花序等園藝性狀 (Griesbach 1981, 1985; Adaniya & Shirai 2001) 的手段。

蝴蝶蘭的多倍體化於自然界中發生的機率低，必須藉由人工誘導的方式提高多倍體之育成

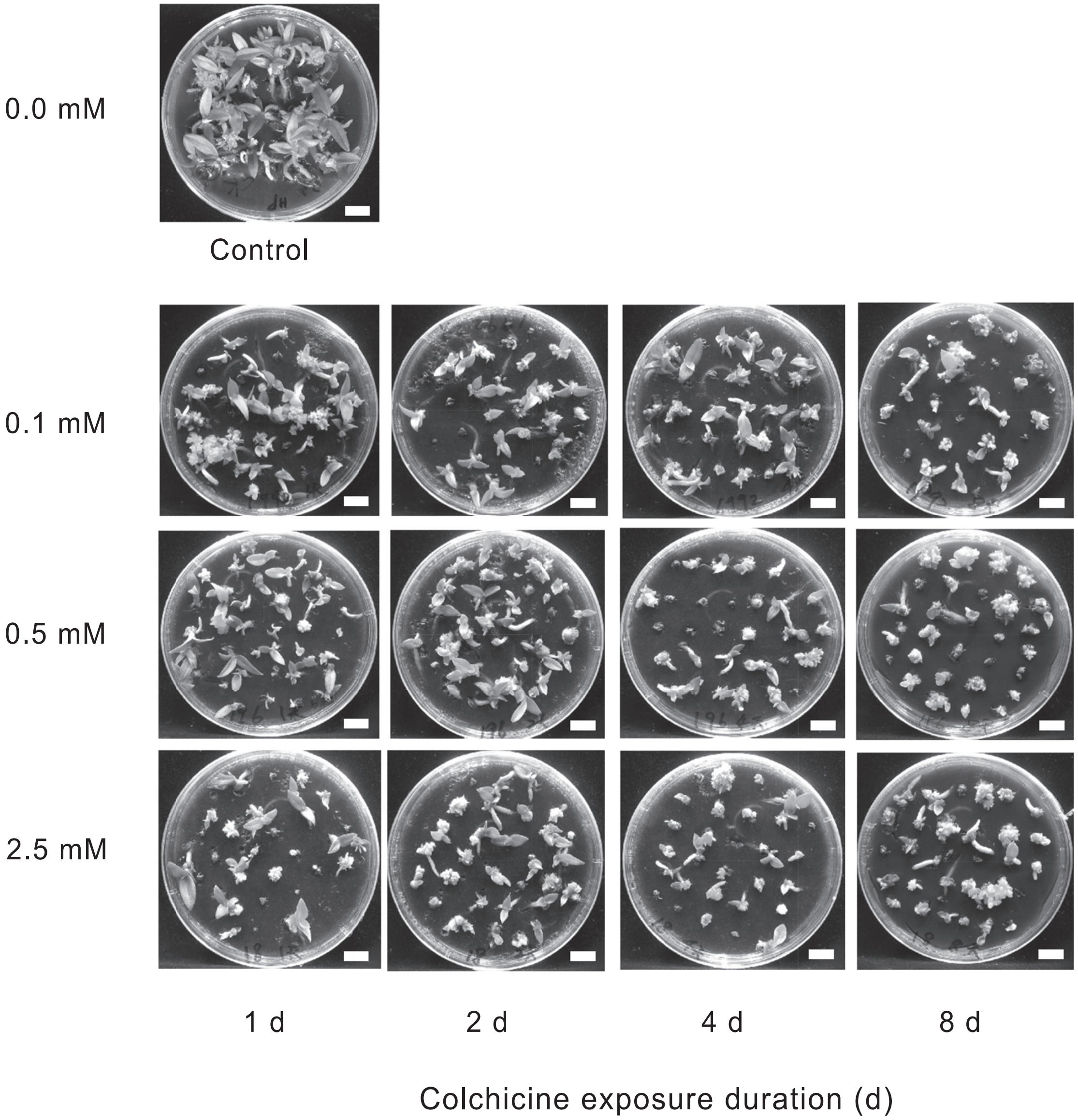



**圖1.** 以0.1、0.5、2.5 mM秋水仙素處理藍紫色原生種蝴蝶蘭*Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* 原球體1、2、4、8 d後經 8 wk 培養後之生長情形。花寶 1 號 (HYPONeX No. 1. N : P : K = 7 : 6 : 19) 培養基組成為 2 g $L^{-1}$ 花寶 1 號、1 g $L^{-1}$ Peptone、1% 蔗糖、2 g $L^{-1}$ 活性碳、25 g $L^{-1}$ 香蕉、50 g $L^{-1}$ 馬鈴薯以及 8 g $L^{-1}$ bacto agar。對照組 (control) 為未經秋水仙素處理之原球體直接接種於花寶 1 號培養基。

**Fig. 1.** Growth of protocorm explants of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* for 8 wk culturing on HYPONeX No. 1. (N : P : K = 7 : 6 : 19) medium contains 2 g $L^{-1}$ HYPONeX No. 1, 1 g $L^{-1}$ Peptone, 1% sucrose, 2 g $L^{-1}$ charcoal, 25 g $L^{-1}$ banana, 50 g $L^{-1}$ potato, and 8 g $L^{-1}$ bacto agar after exposuring with 0.1, 0.5, 2.5 mM colchicine for 1, 2, 4, 8 d in a liquid medium. Control is protocorm explants culturing on the same HYPONeX No. 1 solid medium directly without colchicine exposure treatment. Bar = 1 cm.

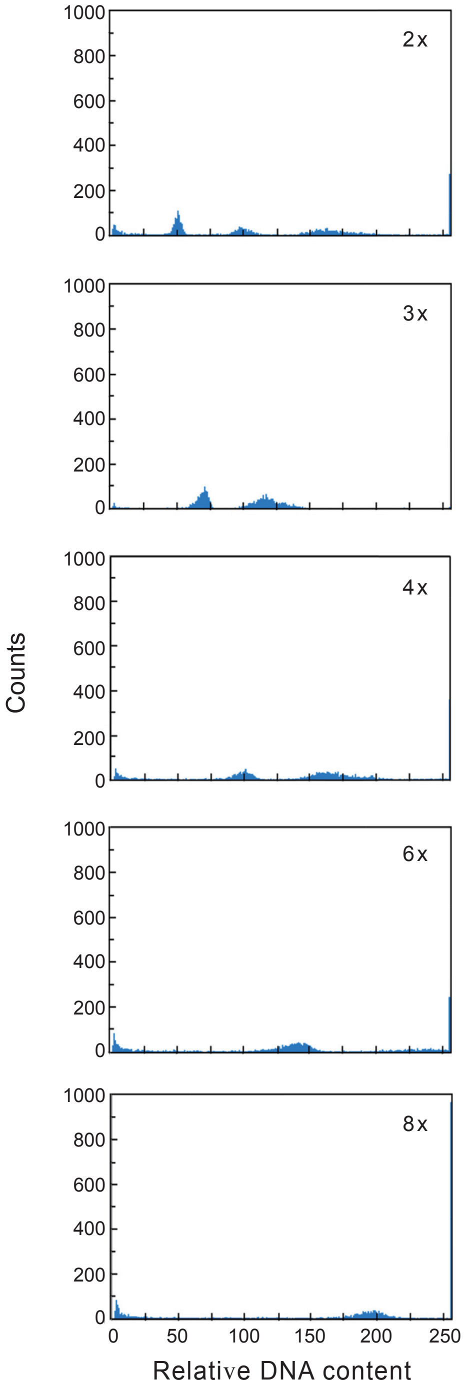



**圖 2.**　利用流式細胞儀分析藍紫色原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*，2x、3x、4x、6x 和 8x 倍數體之圖譜。

**Fig. 2.**　Flow of cytometric histograms of 2x, 3x, 4x, 6x, and 8x types of ploidy of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* plantlets.

率 (Griesbach 1981)。因此，培植體的選擇與培養條件的配合，對於以人為的方式進行多倍體誘導的效果相當重要 (Chakraborti *et al*. 1998)。Azmi *et al*. (2016) 以秋水仙素處理授粉後 3 d 蝴蝶蘭花朵之柱頭與子房，果莢成熟後經無菌播種，4 倍體植株的誘導率可達 100%。以離體方式誘導多倍體時，可採用分化能力較強的培植體如根莖 (rhizome)、原球體等，希望藉由培植體細胞高度分裂及生長發育之特性，提高秋水仙素施用之效果。由於蝴蝶蘭原球體具有前述之特性，是多倍體誘導最佳之材料 (Griesbach 1981; Hsia *et al*. 2010)，因此本試驗亦以藍紫色原生種蝴蝶蘭 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 原球體為多倍體誘導材料。除本身所具有高度生長分化的能力外，在可取得培植體數量上亦具有優勢，且有良好之多倍體誘導效果。

根據本研究與其他學者的研究結果皆顯示，秋水仙素濃度的高低、處理時間的長短以及培植體的特性，皆會影響培植體存活與多倍體誘導效果。Griesbach (1981) 以 50 mg $L^{-1}$ (約 0.13 mM) 秋水仙素處理蝴蝶蘭原球體 10 d，其多倍體誘導率為 48% (4 倍體 46%、8 倍體 2%)，以 4 倍體為主要多倍體，其他倍體數僅占極低的比率，與本研究結果相似。Azmi *et al*. (2016) 分別以秋水仙素 50 mg $L^{-1}$ (約 0.13 mM) (3–5 d) 與 500 mg $L^{-1}$ (約 1.3 mM) (5 d) 處理原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis amabilis* 授粉後 3 d 花朵之柱頭與子房，4 倍體植株誘導率分別為 60% 與 100%，若以高濃度 1,000–2,000 mg $L^{-1}$ (約 2.6–5.2 mM) 處理則子房容易黃化，可獲得果莢數少。Hsia *et al*. (2009) 利用液態培養的方式，以 2.5 mM 秋水仙素處理 10 wk 齡的台灣金線連根莖 24 h，多倍體的誘導率可達 54.6%，且培植體存活率高；以低濃度 0.625 mM 秋水仙素固體培養處理台灣金線連根莖 2 wk，雖然多倍體誘導率最佳 (44.8%)，但因處理時間過長，導致培植體存活率偏低 (20.4%)，且在含有 2.5 mM 秋水仙素之液體培養處理時間延長至 48 h 後，多倍體的比例不再隨之增加，但成活率有下降趨勢，與本研究結果相似。此外，Hsia *et al*. (2010) 於液態培養基中添加 1.25 mM 秋水仙素處理台灣金線連頂芽培植體 3 d，其多倍體誘導率可高達 88.9%，以 2.5 mM 秋水仙素處理台灣金線連莖

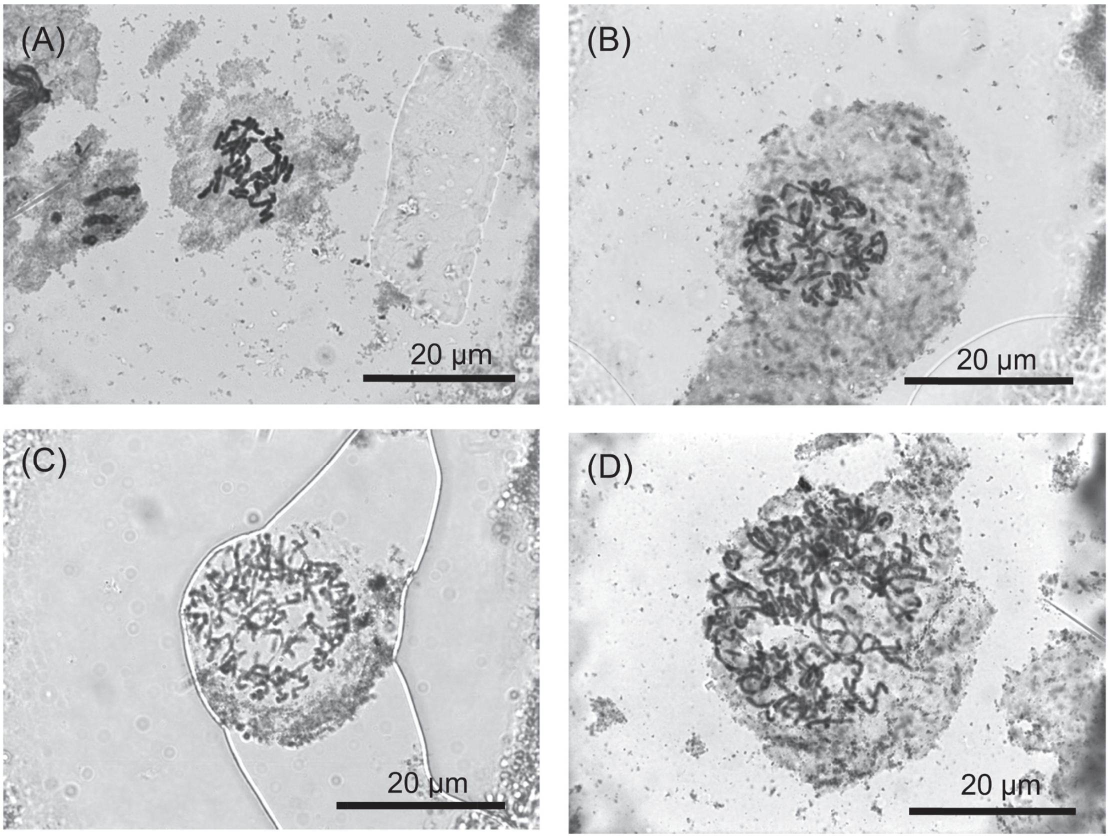



**圖 3.** 藍紫色原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* 各種倍體數之瓶內苗株其根尖染色體染色分析 (A) 2n = 2x = 38、(B) 2n = 4x = 76、(C) 2n = 6x = 114 和 (D) 2n = 8x = 152。

**Fig. 3.** Squash staining in root tip chromosomes of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* with chromosome number of (A) 2n = 2x = 38, (B) 2n = 4x = 76, (C) 2n = 6x = 114, and (D) 2n = 8x = 152.

**表 2.** 比較 2 倍體藍紫色原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* 與誘導所得之 4 倍體植株之園藝性狀。

**Table 2.** Comparison on horticultural traits between diploid and tetraploid plants of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*[z].

| Ploidy | Flower diameter (cm) | Stalk length (cm) | Stalk diameter (mm) | Leaf length (cm) | Leaf width (cm) | Ovary length (cm) | Ovary width (mm) | Capsule length (cm) | Capsule width (cm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Diploid | 2.4 ± 0.0 b[y] | 46.5 ± 2.6 a | 2.6 ± 0.0 b | 14.7 ± 0.7 a | 2.3 ± 0.1 b | 1.8 ± 0.2 b | 1.6 ± 0.0 b | 2.4 ± 0.1 b | 0.7 ± 0.0 b |
| Tetraploid | 3.0 ± 0.0 a | 38.4 ± 2.1 b | 3.1 ± 0.1 a | 12.2 ± 0.8 b | 3.5 ± 0.1 a | 2.0 ± 0.1 a | 2.0 ± 0.0 a | 3.2 ± 0.1 a | 0.9 ± 0.0 a |

[z] Diploid and tetraploid plants were cultivated in a pad and fan green house for 60 wk, and 7 of diploid and tetraploid plants which flowering at the same time were used for horticultural traits investigation. Stalk length did not include inflorescence length, stalk diameter was measured in the third section of stalk, leaf length and width were measured in the largest leaf, and seed capsule length and width (not include gynophore) were measured 12 wk after pollination.

[y] Means in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.

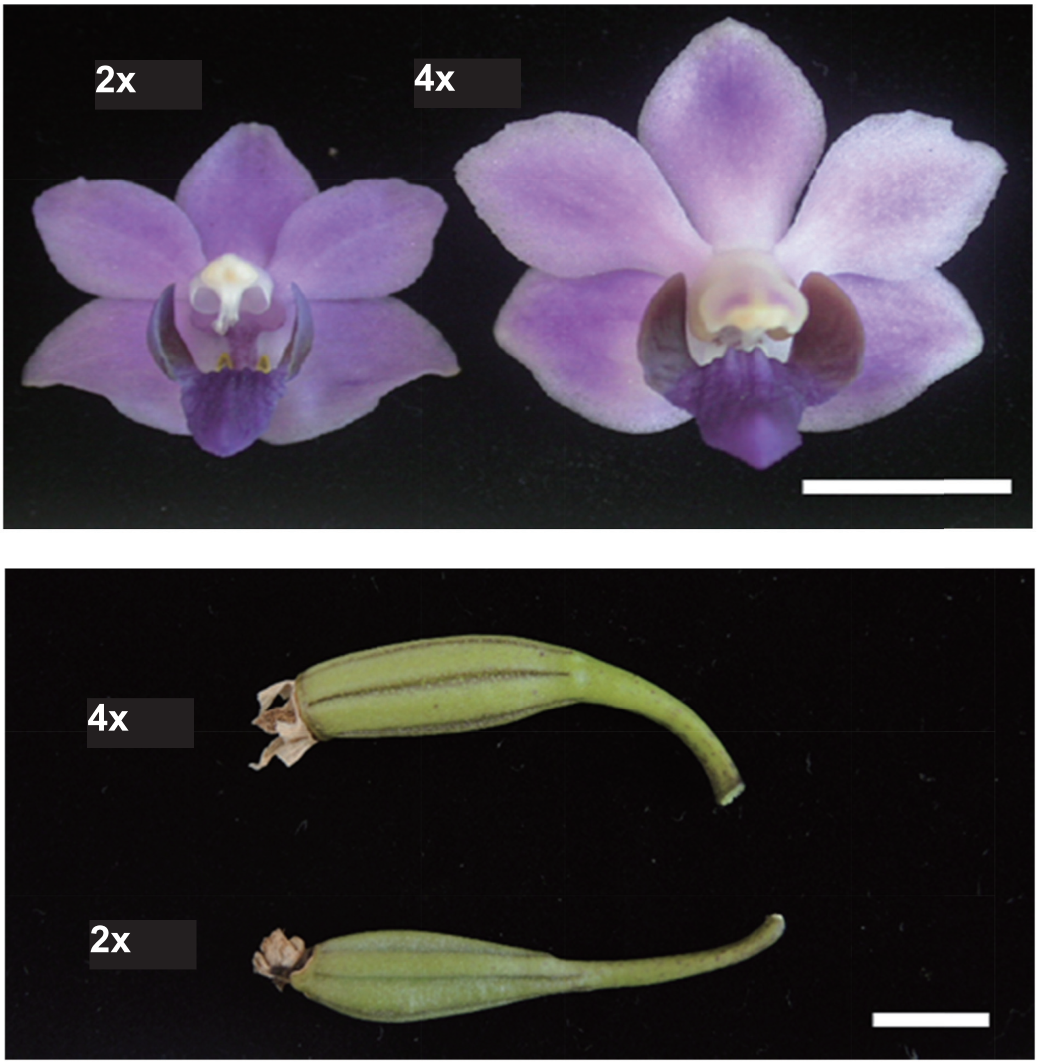



**圖 4.** 藍紫色蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* 2 倍體與 4 倍體植株之花朵與果莢之形態。

**Fig. 4.** Flower and capsule traits of diploid and tetraploid plants of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*. Bar = 1 cm.

節培植體 6 d，其多倍體誘導率雖可達 100%，但僅得 2 株成活植株，而以 6.25 mM 秋水仙素處理，芽體繼代後皆褐化死亡。Blasco *et al.* (2015) 分別以 0.01–0.05% 秋水仙素處理枇杷瓶苗莖頂 1–3 d，多倍體誘導效果最佳，可獲得最多 43 株多倍體苗株，其次為以 0.1% 秋水仙素處理整株小苗 15–60 min，可獲得 16 株多倍體，而以 0.1–0.5% 秋水仙素處理未發芽之枇杷種子 1–2 d 效果最差，僅得 8 株多倍體。

本研究以藍紫色原生種蝴蝶蘭 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 之原球體為材料，以秋水仙素 (0.1、0.5、2.5 mM) 處理 1 d 有最高的存活率 (85.5–93.3%)，隨著秋水仙素處理濃度與天數的增加，存活率略降至 69.6–72.5%，但可誘導出多倍體 (3x、4x、6x、8x) 的比率提升，可達 46%。觀察秋水仙素處理原球體後續之生長與分化情形，發現以 0.1 mM 秋水仙素處理 8 d 原球體之生長與分化受抑制，隨著處理濃度的增加 (0.5 mM 及 2.5 mM 秋水仙素處理 8 d)，原球體生長與分化受抑制之情形更為明顯，植株生長

緩慢，且存活率有下降的趨勢，顯示出培植體、秋水仙素濃度及處理時間必須適當配合方能提高多倍體之誘導效率。

除了以秋水仙素、歐拉靈 (oryzalin)、三福林 (trifluralin) 等抗微管藥劑可誘導多倍體外 (Hsia *et al*. 2010; Talebi *et al*. 2017)，亦可以物理方式促進多倍體的誘導，Chen *et al*. (2009) 利用原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* 原球體中所發現之內生性染色體多倍化現象，以物理切割原球體的方式，將 3–5 mm 大小的原球體均等份水平切割為片狀培植體，於固體培養基中誘導長出具有多倍化的擬原球體，此法可避免藥劑處理對培植體生長產生抑制之現象。

本研究除了以流式細胞儀進行染色體之倍體數分析之外，亦利用根尖染色進行染色體分析，除了 3 倍體植株因瓶苗汙染與苗株死亡而無法進行染色體分析外，其餘之多倍體數植株皆可觀察到染色體。然而 6 倍體與 8 倍體植株的染色體收縮程度不夠，不易觀察到清楚的染色體影像，因此染色體之計數難以進行。推測可能因多倍體材料體型較大，根尖也較粗，造成分析過程中組織難以分散，細胞聚集堆疊的結果造成染色體較不易被分散，造成樣品不易觀察。可藉由藥劑濃度、前處理時間及加長根尖在鹽酸溶液中的軟化時間，或提高鹽酸濃度的調整，加以改進 (Kuo *et al*. 2005)。流式細胞儀與根尖染色體分析方法相較，前者是較為簡易快速之多倍體鑑別方法，尤其在樣品數眾多時，流式細胞儀的使用可節省許多的人力、時間，並提高鑑別之正確度。

本研究針對已開花之 4 倍體植株與對照組 (2 倍體) 植株之園藝性狀進行比較，結果顯示 4 倍體植株具有較大的花徑、果莢、梗徑與子房徑、葉片寬短、花梗較短及花朵質地厚實堅挺等特性，與 Osborn *et al*. (2003)、Griesbach (1981, 1985)、Chen *et al*. (2009) 等研究結果所顯示出之多倍體化可以增大植物器官、改善花徑、花形、花朵質地與花序長度等園藝性狀的結果相似。至於多倍體是否可克服雜交不親和性方面，未來將更進一步以雜交方式進行測試。

綜合本研究之結果顯示，雖然以 2.5 mM 秋水仙素處理原球體 8 d 可獲得較高的 4 倍體誘導率 (40%)，但原球體生長與分化受抑制之情形明顯，植株生長緩慢；但以 0.1 mM 秋水仙素處理 8 d 之 4 倍體誘導率亦可達 40% 左右，雖然多倍體誘導率與存活率於二處理間皆無顯著差異。惟後者原球體生長與分化受抑制之情形，較 2.5 mM 秋水仙素處理 8 d 者輕微，且原球體生長較正常與快速。因此，建議以 0.1 mM 秋水仙素處理藍紫色原生種蝴蝶蘭 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 原球體 8 d，作為多倍體誘導處理組合，對於培植體的存活率與生長之影響較小，並可得到數量較多與品質較佳的多倍體植株。

## 誌謝

本研究承國立高雄大學生命科學系鄧澄欣前博士後研究員、陳文輝博士指導流式細胞儀分析技術與蝴蝶蘭對照材料提供，本所花卉研究中心蔡嫺婷博士協助論文審閱與校正，台南區農業改良場徐淑菁前助理研究員、張淯茱前助理研究員協助指導根尖染色體染色分析技術，以及李芸嫣前計畫助理協助執行染色體分析工作，特此致謝。

## 引用文獻

Adaniya, S. and D. Shirai. 2001. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. Sci. Hortic. 88:277–287.

Arends, J. C. 1970. Cytological observations on genome homology in eight interspecific hybrids of Phalaenopsis. Genetica 41:88–100.

Azmi, T. K. K., D. Sukma, S. A. Aziz, and M. Syukur. 2016. Polyploidy induction of moth orchid [*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume] by colchicine treatment on pollinated flowers. J. Agric. Sci. 11:62–130.

Blasco, M., M. L. Badenes, and M. M. Naval. 2015. Polyploid induction via colchicine treatment in loquat. Acta Hort. 1092:43–47.

Chakraborti, S. P., K. Vijayan, B. N. Roy, and S. M. H. Qadri. 1998. *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). Plant Cell Rep. 17:799–803.

Chen, W. H., C. Y. Tang, and Y. L. Kao. 2009. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species.

Plant Cell Tiss. Org. 98:229–238.

Christenson, E. A. 2001. *Phalaenopsis*: A Monograph. Timber Press. Portland, OR. 330 pp.

Griesbach, R. J. 1981. Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. Plant Cell Tiss. Org. 1:103–107.

Griesbach, R. J. 1985. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. J. Hered. 76:74–75.

Griesbach, R. J. 2005. A scientific approach to breeding blue orchids: Exploring new frontiers in search of elusive flower colors. Orchids 74:376–379.

Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and S. S. Tsay. 2009. *In vitro* induction of polyploidy from rhizomes of *Anoectochilus formosanus*. J. Taiwan Agric. Res. 58:302–309. (in Chinese with English abstract)

Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and H. S. Tsay. 2010. *In vitro* induction of polyploidy from nodal explants of *Anoectochilus formosanus*. J. Taiwan Agric. Res. 59:165–176. (in Chinese with English abstract)

Kuo, H. L., C. I. Ke, Y. S. Chen, S. W. Chin, and F. C. Chen. 2005. Study on root tip squash and staining techniques of *Phalaenopsis* orchids. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 51:339–346. (in Chinese with English abstract)

Osborn, T. C., J. C. Pires, J. A. Birchler, D. L. Auger, Z. J. Chen, H. S. Lee, L. Comai, A. Madlung, R. W. Doerge, V. Colot, and R. A. Martienssen. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. Trends Genet. 19:141–147.

Tsao, C. Y. 2013. Blue flower breeding of *Phalaenopsis*. p.78–85. *in*: Proceeding of Symposium on Orchid Breeding in Taiwan. October 23, 2013. Taichung, Taiwan. Taiwan Orchid Breeders Soc. Pub., Changhua, Taiwan. (in Chinese)

Talebi, S. F., M. J. Saharkhiz, M. J. Kermani, Y. Sharafi, and F. R. Fard. 2017. Effect of different antimitotic agents on polyploid induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.). Caryologia 70:184–193.

Wang, Y. T. 2004. Flourishing market for potted orchid. Flower Tech. 7:2–5.

# Effects of Colchicine Treatments on Polyploidy Induction Using Protocorms of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*

Chin-Yi Tsao[1], Uei-Chern Chen[1], Rung-Yi Wu[2], Tzu-Ying Wu[3], and Chi-Ni Hsia[4,*]

## Abstract

Tsao, C. Y., U. C. Chen, R. Y. Wu, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2018. Effects of colchicine treatments on polyploidy induction using protocorm of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*. J. Taiwan Agric. Res. 67(3):247–257.

Effects of colchicine concentration and exposure time on polyploidy induction, using 6-wk-old protocorms of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*, were conducted in this study. Ploidy levels of seedlings derived from colchicine treatments were analyzed by flow cytometry and chromosome counting of root tips. Results showed that the highest survival rates of 85.5–93.3% were found on protocorms exposed with various concentrations of colchicine for 1 d. It was found that survival rate decreased along with colchicine exposure time. In addition, both factors of colchicine concentration and exposure time had significant interaction on survival rate of protocorms. Both 0.1 mM colchicine for 1 d and 2.5 mM colchicine for 8 d had the highest polyploidy induction rates of 43.9% and 46.0%, respectively. However, a better growth of protocorms as well as plantlet development was observed from the former treatment. Comparison on horticultural traits of diploid and tetraploid plants showed that tetraploid with lager flowers and seed capsules, thicker diameter of stalk and ovary, shorter length of leaf and stalk, and thicker texture of petal were observed. Although tetraploid plants show better horticultural traits than that of diploid plants, their hybridization affinity needs more cross investigations for further information.

**Key words:** *Phalaenopsis*, Protocorm, Colchicine, Polyploidy, Flow cytometry.

---

Received: August 15, 2017; Accepted: December 17, 2017.
[*] Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yulin, Taiwan, ROC.
[3] Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(3):258–269 (2018)
DOI:10.6156/JTAR.201809_67(3).0003

研究報告

# 營農型光電溫室環境對多種葉菜類蔬菜生長之影響

李香誼[1] 李碩朋[2] 許淼淼[1,*] 羅惠齡[1]

## 摘要

李香誼、李碩朋、許淼淼、羅惠齡。2018。營農型光電溫室環境對多種葉菜類蔬菜生長之影響。台灣農業研究 67(3):258–269。

為配合政府推行綠能發電結合農業生產的政策，本試驗目的為探討在營農型光電溫室的遮光環境中，適合秋冬季栽培的蔬菜種類與品種。本試驗於遮蔽率 40% 之屋頂式營農型光電溫室下進行有機葉菜類栽培評估，評估結果以青梗白菜「綠光一號」與「綠愛」之產量較佳；小白菜篩選出「泉州白菜」、「蜜雪兒」、「翠鳳」與「503 號蚵仔白菜」；油菜為「青龍」、「阿茵」與油菜 (未有商品名；鄭奇種苗)；芥藍則以 $F_1$ 品種「一嘉」與「藍星」產量顯著較高；芥菜以「台農 3 號」與「青和」之單株重與小區產量較佳。目前葉菜類品項評估結果中，小白菜可達農業統計年報不結球白菜平均 3 年單位面積產量 70%，其採收期為定植後 16 d，相對較其他蔬菜短、且複作指數高，為目前評估結果中最適合在營農型光電溫室下栽培的葉菜品項。由本試驗環境條件推論，其他葉菜類如透過栽培技術改進與品種選擇，投入適當資源、資材，可能也有機會達到常態環境下 70% 產量。

**關鍵詞**：營農型光電溫室、遮蔽率、蔬菜栽培、品種篩選。

## 前言

營農型的光電 (伏) 溫室 (photovoltaic greenhouse; PV greenhouse)，屬於農電系統 (agrivoltaic systems; AV systems) 的一類，其定義為同時同地結合太陽能板發電與作物生產的系統，起初構想是為了調和能源作物和糧食作物對土地利用的競爭 (Dupraz *et al*. 2011)。政府為推動綠色能源利用，在符合「申請農業用地作農業設施容許使用審查辦法」(以下簡稱容許辦法) 第 28 條規定並通過審認情況下，允許農業設施附屬設置綠能設施，得以在農地上同時進行農業經營及綠能發電使用。對於依照容許辦法第 28 條規定審認通過的屋頂式營農型光電設施，其以透明材質搭建的溫室附屬之綠能設施，其太陽能板覆蓋的遮蔽率不得大於 40%，且農業經營的農作生產量相較於過去三年平均正常生產量，必須達到 70% 以上 (Department of Planning, Council of Agriculture 2017)。

營農型光電溫室設置的太陽能板下方會產生遮蔽的陰影，造成作物受到部分或間歇的遮蔭，減少作物可利用的平均光照。通常當水分與氮源沒有受到限制時，植物生物量積累主要來自光源的擷取。陰影形成的光照不足情況減緩作物生長，也影響作物發育成熟的過程，乃至減少成熟期的總生物量 (Kitaya *et al*. 1998; Dapoigny *et al*. 2000; Cantagallo *et al*. 2004)。

太陽能板設置的方式亦影響作物產量的表現，比較直列式 (或稱行陣式；PV straight array) 和棋盤式 (PV checkerboard array) 的排列，兩者年平均光量子通量密度無顯著差異，但季節造成光線角度的變化，使直列式溫室栽培的青蔥鮮、乾重減少的比例高於棋盤式者，主要原因是直列式太陽能板於作物生長過程中投射陰影於特定區域，棋盤式則間歇地投射陰影 (Kadowaki *et al*. 2012)。

投稿日期：2017 年 9 月 19 日；接受日期：2018 年 1 月 18 日。
* 通訊作者：mmhsu@fthes-tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所蔬菜系助理研究員。台灣 高雄市。
[2] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所蔬菜系副研究員。台灣 高雄市。

植物呼吸作用產生的 $CO_2$ 與光合作用吸收的 $CO_2$ 等量時的光強度，即被稱為光補償點；當光強度高於光補償點，植物進行光合作用形成的產物才得以運用於生長；然而，隨著光強度的增加，光合速率提升，直到光照強度超過一定範圍，光合速率不再增加時，則達到所謂的光飽和點 (Pan 2013)。因此，在特定光強度範圍內，當其他環境及營養狀況均相同時，光照是主要影響作物生長的限制因子。

Marrou *et al*. (2013) 研究指出在全日照生長下的萵苣葉數最多，隨著太陽能板的密度提高，遮光程度增加，在溫室內太陽能板透光率 63–74% 及透光率 48–56% 之環境下生產，葉片數隨著透光率下降而遞減；然而遮光程度提高，葉面積與乾重的比值增加，葉片變得大且薄，表示萵苣具有在可用光源減少的情況下，有效增加葉面積的能力，期以彌補光照的降低。Tani *et al*. (2014) 比較溫室內有太陽能板 (遮光率 50%) 的處理組與無太陽板的對照組之環境下栽培萵苣，發現與 Marrou *et al*. (2013) 的研究有相似情形，且葉片葉綠素及抗壞血酸含量減少；若搭配光散射膜，能有效減緩因太陽能板陰影產生光線不均的問題，而可稍加改善作物生長。

在相同的光截取率下，不同品種對光的轉換效率也有差異 (Marrou *et al*. 2013)。部分作物擁有較低的光飽和點或較小的碳水化合物積貯器官，可能適合於太陽能板遮蔽的陰影下栽培 (Kadowaki *et al*. 2012)。因此，篩選適合營農型光電溫室遮蔭環境下栽培的作物種類與品種格外重要，可以提供有意在此情境下進行農作栽培經營者參考。

為了篩選適合光電溫室栽培之蔬菜，本研究以數種葉菜類蔬菜種類與品種作為材料，評估於實際營農型光電溫室內及模擬營農型光電溫室的遮蔭環境下蔬菜栽培的可行性，以篩檢出適合此環境生產的蔬菜種類與品種。

## 材料與方法

以葉菜類品項為參試材料，分別為青梗白菜 (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *communis*)、小白菜 (*Brassica campestris* L. spp)、芥藍 (*Brassica oleracea* L. Alboglabra Group)、油菜 (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *utilis*) 及芥菜 (*Brassica juncea* Coss.)，品種及來源如表 1 至表 5。試驗期間自 2016 年 9 月 22 日起，先於鳳山熱帶園藝試驗分所以 128 格穴盤育苗，3 wk 後，再移至營農型光電溫室內定植 (表 6)。

營農型光電溫室位於民間向陽優能電力公司屏東縣枋寮鄉的有機蔬菜生產園區，試驗場地原種植可可、香蕉、番茄等作物，力霸型溫室，方位呈東西向，高度約 6 m。太陽能板設置於溫室屋頂上方，並呈南北向排列，遮蔽率約40% (圖 1)。試驗期間於溫室前、中、後段與溫室外各設置一組溫光照記錄器 (UA-002-64, HOBO, Onset Computer Corp., Bourne, MA, USA) 與溫濕度記

**表 1.** 青梗白菜評估品種清單。

**Table 1.** Cultivar list of Pak-Choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *communis*) for the experiment.

| Cultivar | Origin |
|---|---|
| ‘Hua Guan’「華冠」 | The Musashino Seed Co., Ltd. (武蔵野種苗園株式会社) |
| ‘Lü Guang No.1’「綠光一號」 | Zhuo Rui He Seed Co., Ltd. (周瑞和股份有限公司) |
| ‘Oprah’「綠愛」 | Known-You Seed Co., Ltd. (農友種苗股份有限公司) |
| ‘Xia Guan’「夏冠」 | Taiwan Agricultural Development Co., Ltd. (台灣農產企業股份有限公司) |
| ‘CR Si Ji’「CR 四季」 | Tohoku Seed Co., Ltd. (トーホク株式会社) |
| ‘Yi Jiang’「一江」 | Tohoku Seed Co., Ltd. (トーホク株式会社) |
| ‘Natsu tei’「夏帝」 | Sakata Seed Co., Ltd. (サカタのタネ株式会社) |
| ‘Seitei’「青帝」 | Sakata Seed Co., Ltd. (サカタのタネ株式会社) |
| ‘Quan Sheng No.1’「全盛一號」 | All Lucky Seed Co., Ltd. (全福種苗股份有限公司) |
| ‘CR Xia Zhuan Ke’「CR 夏專科」 | Tohoku Seed Co., Ltd. (トーホク株式会社) |

表 2. 小白菜評估品種清單。

**Table 2.** Cultivar list of non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. spp) for the experiment.

| Cultivar | Origin |
|---|---|
| 'Xin Si Ji Cai'「新四季彩」 | Tohoku Seed Co., Ltd. (トーホク株式会社) |
| 'Mi Xue Er'「蜜雪兒」 | Known-You Seed Co., Ltd. (農友種苗股份有限公司) |
| 'Cui Feng'「翠鳳」 | Known-You Seed Co., Ltd. (農友種苗股份有限公司) |
| 'San Feng No.2'「三鳳二號」 | Known-You Seed Co., Ltd. (農友種苗股份有限公司) |
| 'Quan Zhou Bai Cai'「泉州白菜」 | First Seed Co., Ltd. (第一種苗股份有限公司) |
| 'Shikinoiroi'「四季的彩」 | First Seed Co., Ltd. (第一種苗股份有限公司) |
| 'E Zi Bai Cai No.503'「503 號蚵仔白菜」 | Bestow Seed Co., Ltd. (禾峰種子有限公司) |
| 'Jing Yan No.2'「京研快菜二號」 | National Engineering Research Center for Vegetables (國家蔬菜工程技術研究中心) |

表 3. 芥藍評估品種清單。

**Table 3.** Cultivar list of Chinese kale (*Brassica oleracea* L. Alboglabra Group) for the experiment.

| Cultivar | Origin |
|---|---|
| 'New Veg-Gin'「永春」 | Known-You Seed Co., Ltd. (農友種苗股份有限公司) |
| 'Green Delicacy'「翠津」 | Known-You Seed Co., Ltd. (農友種苗股份有限公司) |
| 'Yi Jia'「一嘉」 | Wellson Seed Co., Ltd. (良子種苗有限公司) |
| 'Lan Xing'「藍星」 | Pan-Asian Seeds Co., Ltd. (誼禾種苗有限公司) |
| Pan Chou Yeh Kale (半皺葉芥藍)[z] | Ming Feng Seed Co., Ltd. (明豐種苗有限公司) |
| Pan Chou Yeh Kale (半皺葉芥藍)[z] | Gong Nong Seed Co., Ltd. (功農種苗有限公司) |

[z] No specific cultivar name.

表 4. 油菜評估品種清單。

**Table 4.** Cultivar list of rape (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *utilis*) for the experiment.

| Cultivar | Origin |
|---|---|
| 'Yu Quan Cai Xin'「玉泉菜心」 | Po Yu Trading Co., Ltd. (豐田種苗行) |
| 'Qing Long'「青龍」 | Xin Yu Sen seed store (新裕森種苗行) |
| 'All In'「阿茵」 | Known-You Seed Co., Ltd. (農友種苗股份有限公司) |
| Rape (油菜)[z] | Zheng, Xing-Tai (鄭興泰) |
| 'Fu Lu Tian'「福祿甜」 | Ming Feng Seed Co., Ltd. (明豐種苗有限公司) |
| Rape (油菜)[z] | Cheng Chi Seed Grower Co., Ltd. (鄭奇種苗有限公司) |
| Rape (油菜)[z] | Nian Feng seed store (年豐種子行) |

[z] No specific cultivar name.

錄器 (UA-002-64, HOBO, Onset Computer Corp., Bourne, MA, USA)。

配合農場的栽培模式，栽培管理以有機方式進行，試驗採逢機完全區集設計。葉菜類每品種三重複，每重複 18–20 株，於畦面覆蓋塑膠布，栽植行株距為 15 cm × 15 cm。採收後調查單株重 (g)、小區產量 (g $m^{-2}$)、株高 (cm)、葉基到心部高 (cm)、葉數、葉長 (cm)、葉寬 (cm)、葉柄長 (cm) 與葉柄寬 (cm) 及葉綠素相對含量值 (SPAD 502, Spectrum Technologies, Inc., Aurora, IL, USA)。

本研究以 CoStat 6.2 統計軟體 (CoHort Software, Berkeley, CA, USA) 進行最小顯著性差異法 (least significant difference; LSD)，分析品種間有無顯著差異。

表 5. 芥菜評估品種清單。

**Table 5.** Cultivar list of mustard (*Brassica juncea* Coss.) for the experiment.

| Cultivar | Origin |
|---|---|
| 'Xiao Yi'「小刈」 | Xin Yu Sen seed store (新裕森種苗行) |
| 'Tainung No.2'「台農二號」 | Fengshan Tropical Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute |
| 'Tainung No.3'「台農三號」 | Fengshan Tropical Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute |
| 'Qing He'「青和」 | Known-You Seed Co., Ltd. (農友種苗股份有限公司) |
| 'Xiao Yi'「小刈」 | Jin Ri seed store (今日種子行) |
| 'Xiao Yi'「小刈」 | Hong Xin seed store (宏信種子行) |
| 'Ke Ren Yi'「客人刈」 | Ming Feng Seed Co., Ltd. (明豐種苗行) |
| 'Xue Li Hong'「雪裡紅」 | Xie Mian seed, fertilizer and pesticide store (謝綿種子農藥肥料行) |

表 6. 青梗白菜、小白菜、芥藍、油菜及芥菜之播種、定植和採收日期。

**Table 6.** Seeding, transplanting, and harvest dates of Pak-Choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *communis*), non-heading Chinese cabbages (*Brassica campestris* L. spp), Chinese kale (*Brassica oleracea* L. Alboglabra Group), rape (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *utilis*), and mustard (*Brassica juncea* Coss.).

| Species | Seeding date | Transplanting date | Harvest date |
|---|---|---|---|
| Pak-Choi | 09/22/2016 | 10/14/2016 | 11/03/2016 (20 DAT[z]) |
| Non-heading Chinese cabbage | 09/27/2016 | 10/18/2016 | 11/03/2016 (16 DAT) |
| Chinese kale | 10/04/2016 | 10/27/2016 | 11/22/2016 (26 DAT) |
| Rape | 10/11/2016 | 11/02/2016 | 11/15/2016 (13 DAT) |
| Mustard | 10/18/2016 | 11/08/2016 | 12/01/2016 (23 DAT) |

[z] DAT: Days after transplanting, mm/dd/yy.

圖 1. 營農型光電溫室 40% 遮蔽率葉菜類蔬菜作物栽培試驗情形。

**Fig. 1.** The growth of leafy vegetables under photovoltaic greenhouse with 40% coverage of solar panel on the roof.

# 結果與討論

試驗期間遮蔽率 40% 的營農型光電溫室每日累積光合有效輻照較戶外減少 50–70% (圖 2A)，顯示太陽能板遮蔽的程度，與實際量測得到的光照量仍有差距；溫室內部氣溫較外界降低約 1–2℃。在試驗期間，若氣溫低於 25℃，則溫室內外無明顯差異 (圖 2B)。台灣蔬菜多以網室栽培為主，主要目的為保護作物，避免受到外界異常天氣與病蟲害影響，降低生產風險。溫室

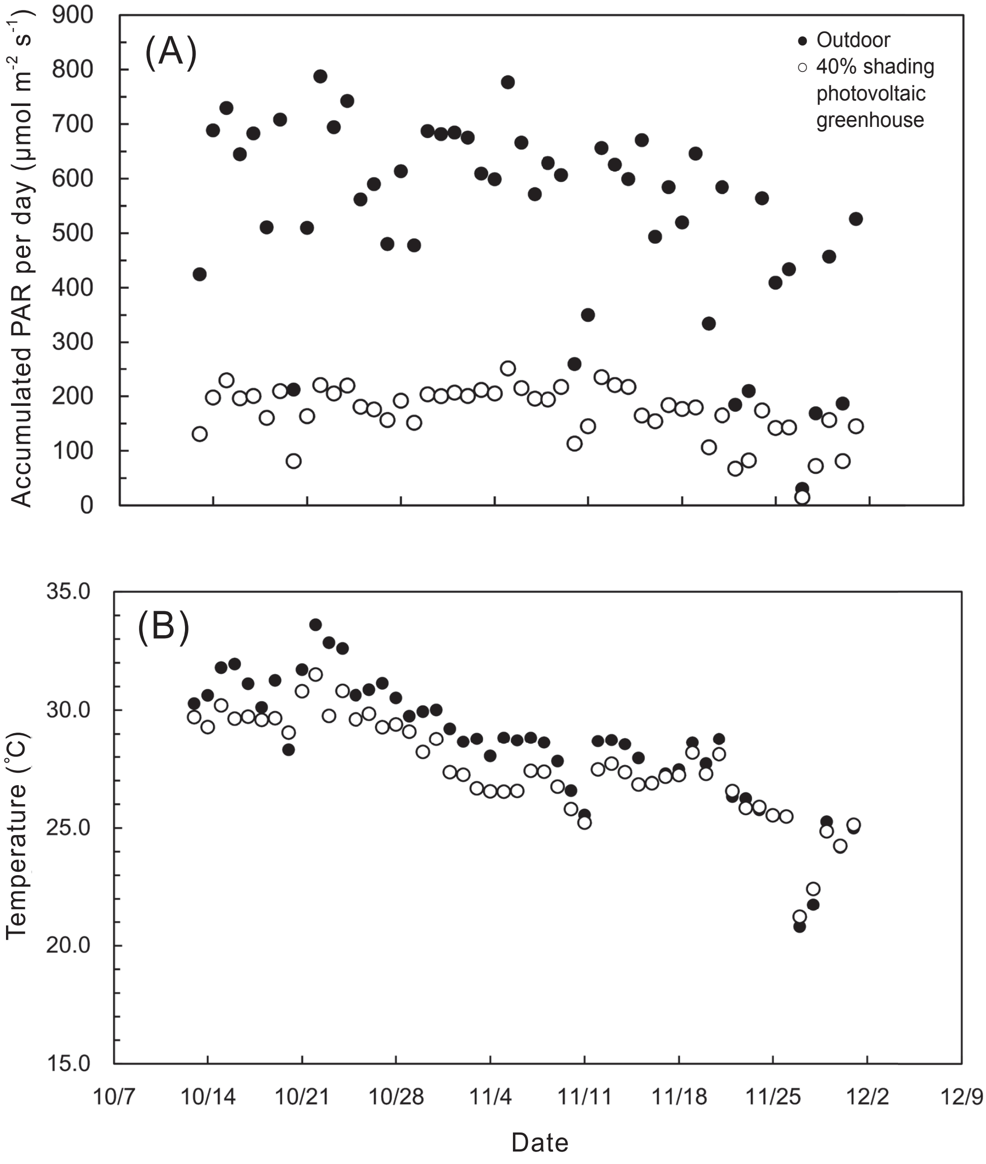



**圖 2.** 試驗期間 40% 遮蔽率營農型光電溫室與戶外之 (A) 每日累積光合有效光量子通量密度比較、(B) 每日平均氣溫比較。

**Fig. 2.** (A) Comparison of the accumulated photosynthetic photon flux density measured and (B) comparison of daily mean air temperature measured inside the photovoltaic greenhouse with 40% coverage (shading) of solar panel on the roof and outdoors.

應用於冬季生產多為保溫用途，冬季期間一般溫室內溫度明顯高於外界溫度，夏季期間溫室內氣溫更高。惟本研究採用之營農型溫室當外界氣溫達 25℃時，溫室內部溫度可降低 1–2℃。換言之，在溫度較高的情況下，本研究之營農型光電溫室內的氣溫略低，與一般設施內常見積熱的情形不同。其原因除了本試驗場地的溫室結構挑高外，推測太陽能板遮蔭造成溫室微氣象的改變，雖阻擋部分的光照，但也降低溫室內部的氣溫，氣溫降低有利於蔬菜栽培及人員作業。

因溫室建置方位為東西向，太陽能板設置呈南北向，太陽隨著時間移動，光線也隨之變動，並未在太陽能板下方的區域產生固定陰影，下方栽種的葉菜植株並未顯著較沒遮蔭的區域矮小，試驗過程中遮蔭種植區域較無因為太陽能板陰影造成植株有大小株的問題。此結果與 Kadowaki *et al*. (2012) 指出太陽能板棋盤式排列，產生間歇的陰影，造成青蔥減產較少的情況相似。

青梗白菜播種後 30–40 d 為採收適期，本試驗經由育苗、定植到採收時間為 43 d，所需時間較一般栽培方式長。其單株重、小區產量及葉數，以「綠光一號」、「綠愛」與「青帝」表現佳，小區產量分別為 1,191 g $m^{-2}$、1,096 g $m^{-2}$ 及 1,077 g $m^{-2}$，單位面積產量每平方公尺均達 1 kg 以上，且前兩者的葉數較多有 12–13 片，「夏帝」產量 451 g $m^{-2}$ 則為最差。根據近 3 年農業統計年報不結球白菜 70% 之單位面積產量為 1,287 g $m^{-2}$，營農型光電溫室因太陽能板遮蔽造成光量減少，而使小區產量無法達到目前訂定的標準。此外，部分品種如「青帝」之葉基到心部高為 13.06 cm，顯著較其他處理 7–8 cm 長，有徒長現象。「全盛一號」為北部主要品種，沒表現出其高腳的特性，其葉柄平均長度 6.61 cm，與中南部大宗的短腳品種「華冠」相當 (表 7)。「全盛一號」與「青帝」的株型較開張，採收後包裝較不易。試驗後期部分品種植株葉片出現反捲，推估是品種的耐熱性不足所造成。

小白菜定植後 2 wk 即達採收標準，生長普遍較青梗白菜佳，除「三鳳二號」單株重 34.7 g 與小區產量 944 g $m^{-2}$ 顯著較低，土白菜類型以「泉州白菜」1,757 g $m^{-2}$ 較高，鹵葉白菜類型則以「蜜雪兒」1,786 g $m^{-2}$、「翠鳳」1,902 g $m^{-2}$ 及「503 號蚵仔白菜」1,865 g $m^{-2}$ 小區產量較高 (表 8)，這些品種外觀接近市面上販售的蔬菜，並達到不結球白菜 70% 產量之標準，且於定植後 2 wk 即達到採收大小，相對於青梗白菜需 3 wk，週轉率更快，為試驗評估的葉菜種類中生產表現最佳之蔬菜種類。

芥藍屬於 $F_1$ 品種的「一嘉」之單株重 31.7 g 與小區產量 771.4 g $m^{-2}$ 較佳，其生長勢旺盛，葉長 12.69 cm 及葉寬 10.65 cm，葉片顯著較大；其次為「藍星」單株重 25.5 g 與小區產量 632.1 g $m^{-2}$，兩品種葉片葉綠素相對含量值分別為 51.5 和 53.3，屬於葉色較濃綠之品種 (表 9)。農民普遍種植的大宗品種「永春」與「翠津」之產量僅 405.9 g $m^{-2}$ 與 364 g $m^{-2}$，顯著較其他品種低。「一嘉」與「藍星」於育苗期間，植株生長健壯，發芽整齊，定植至低光的環境能較快適應，應是 $F_1$ 品種對環境的適應性較強，相對於其他品種能更適應光線較弱的環境，也顯示苗期生長對植株後續發育的重要性。葉用芥藍播種後 35–45 d 採收 (Yang & Lin 2005)，本試驗從播種到採收共 49 d，較一般栽培多 4–14 d。由於農業統計年報中，芥藍無獨立調查的單位面積產量數據，因此將農情報告資源網 (http://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp) 2014–2016 年之單位面積產量平均，可得 1,687 g $m^{-2}$，而試驗結果之產量無法達到 70%，1,180.9 g $m^{-2}$。由此可知，芥藍需延後採收才能達到產量標準，但對於品質的影響，則必須再評估。

油菜品種間之小區產量為 455–653 g $m^{-2}$，無顯著差異，單株重以「青龍」22.9 g、「阿茵」20.5 g、鄭奇種苗 20 g 及年豐種子行 18.9 g 之油菜品種最佳。其中前三者小區產量達 600 g $m^{-2}$ 以上，葉綠素相對含量值達 40 以上，顯著較其他品種高 (表 10)。油菜定植後 2 wk 葉數達 6 片以上，符合採收標準。由於油菜並無單位面積產量相關之統計資料，若以不結球白菜之 70% 產量為 1,287 g $m^{-2}$ 來計算，目前品種產量僅有標準之一半或更低。

芥菜品種間小區產量與單株重以「台農三號」最佳，分別為 813 g $m^{-2}$ 與 29.4 g，其葉數雖不到 5 片，但葉長 21.81 cm 與葉寬 8.6 cm 較大，而重量較高，「青和」以 24.2 g 次之；「客

表 7． 太陽能板遮蔽率 40% 對不同品種青梗白菜植株於營農型光電溫室生長之影響。

**Table 7.** Effects of 40% coverage (shading) of solar panel on the roof on the growth of different cultivars of Pak-Choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *communis*) grown in the photovoltaic greenhouse.

| Cultivar | Average weight (g) | Yield (g m$^{-2}$) | SPAD[z] | Leaf no. | Plant height (cm) | Leaf base to apex (cm) | Leaf length (cm) | Leaf width (cm) | Petiole length (cm) | Petiole width (cm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 'Hua Guan' | 26.3 d[y] | 601 cde | 30.83 e | 10.3 f | 19.25 c | 8.10 bcd | 10.41 e | 5.45 gh | 6.61 d | 0.73 cd |
| 'Lü Guang No.1' | 39.2 b | 1,191 a | 37.11 b | 13.3 a | 27.65 a | 8.83 b | 10.78 de | 6.58 cd | 7.40 ab | 0.62 de |
| 'Oprah' | 43.7 a | 1,096 ab | 33.61 c | 12.6 ab | 20.49 c | 8.37 b | 11.58 bc | 7.06 bc | 6.67 d | 0.73 cd |
| 'Xia Guan' | 25.9 d | 474 de | 36.51 b | 10.6 ef | 19.51 c | 7.26 d | 9.42 f | 5.67 fg | 6.81 cd | 0.59 e |
| 'CR Si Ji' | 35.0 c | 777 bcd | 36.91 b | 11.3 de | 21.38 bc | 8.27 bc | 10.96 cde | 6.20 de | 7.72 ab | 0.98 a |
| 'Yi Jiang' | 37.3 bc | 912 abc | 32.69 cd | 11.9 bcd | 20.81 c | 8.18 bcd | 11.99 ab | 6.85 bc | 7.55 ab | 0.80 bc |
| 'Natsu tei' | 19.0 e | 451 e | 40.59 a | 12.1 bc | 16.90 c | 7.42 cd | 7.73 g | 5.15 h | 5.78 e | 0.63 de |
| 'Seitei' | 37.9 bc | 1,077 ab | 31.62 de | 10.6 ef | 26.94 ab | 13.06 a | 12.55 a | 8.61 a | 7.33 bc | 0.89 ab |
| 'Quan Sheng No.1' | 35.5 bc | 860 bc | 36.65 b | 11.7 cd | 21.50 bc | 8.66 b | 11.18 cd | 7.11 b | 6.61 d | 0.87 ab |
| 'CR Xia Zhuan Ke' | 29.3 d | 684 cde | 36.44 b | 11.2 de | 21.91 bc | 8.27 bc | 10.61 de | 6.02 ef | 7.91 a | 0.73 cd |
| Block | NS[x] | NS | NS | *** | NS | *** | ** | NS | *** | *** |
| Cultivar | *** | *** | *** | *** | ** | *** | *** | *** | *** | *** |

[z] SPAD: Soil and Plant Analyzer Development.

[y] Means of cultivars are averaged from 60 plants of 3 blocks; the same letters are not significantly different with least significant difference test at $P < 0.05$.

[x] NS, **, ***: Non-significant, significant at 0.01, and 0.001 levels, respectively.

表 8. 太陽能板遮蔽率 40% 對不同品種小白菜植株於營農型光電溫室生長之影響。

**Table 8.** Effects of 40% coverage (shading) of solar panel on the roof on the growth of different cultivars of non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. spp) in the photovoltaic greenhouse.

| Cultivar | Average weight (g) | Yield ($g\ m^{-2}$) | SPAD[z] | Leaf no. | Plant height (cm) | Leaf base to apex (cm) | Leaf length (cm) | Leaf width (cm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ‘Xin Si Ji Cai’ | 51.9 bc[y] | 1,432 ab | 17.71 f | 10.4 a | 27.34 d | 10.20 ab | 15.93 b | 10.72 e |
| ‘Mi Xue Er’ | 60.9 a | 1,786 a | 21.71 d | 9.9 ab | 29.84 a | 8.92 c | 18.96 ab | 11.73 bcd |
| ‘Cui Feng’ | 62.3 a | 1,902 a | 30.71 a | 9.1 ab | 28.85 ab | 9.16 bc | 20.27 ab | 13.06 a |
| ‘San Feng No.2’ | 34.7 d | 944 b | 10.87 g | 7.3 b | 28.19 bcd | 8.31 c | 18.24 ab | 12.20 ab |
| ‘Quan Zhou Bai Cai’ | 53.9 bc | 1,757 a | 17.99 f | 9.5 ab | 27.20 d | 8.72 c | 18.45 ab | 12.12 b |
| ‘Shikinoiroi’ | 53.3 bc | 1,442 ab | 20.82 de | 9.6 ab | 28.65 bc | 9.14 bc | 18.37 ab | 11.47 bcde |
| ‘E Zi Bai Cai No.503’ | 58.4 ab | 1,865 a | 24.49 c | 10.2 a | 25.86 e | 6.42 d | 21.98 a | 11.02 de |
| ‘Jing Yan No.2’ | 50.9 c | 1,532 ab | 27.72 b | 11.2 a | 25.88 e | 6.60 d | 18.44 ab | 11.94 bc |
| Block | *** | NS[x] | *** | NS | ** | *** | * | NS |
| Cultivar | *** | * | *** | NS | *** | *** | NS | *** |

[z] SPAD: Soil and Plant Analyzer Development.
[y] Means of cultivars are averaged from 57 plants of 3 blocks; the same letters are not significantly different with least significant difference test at $P < 0.05$.
[x] NS, *, **, ***: Non-significant, significant at 0.05, 0.01, and 0.001 levels, respectively.

表 9. 太陽能板遮蔽率 40% 對不同品種芥藍植株於營農型光電溫室生長之影響。

**Table 9.** Effects of 40% coverage (shading) of solar panel on the roof on the growth of different cultivars of Chinese kale (*Brassica oleracea* L. Alboglabra Group) grown in the photovoltaic greenhouse.

| Cultivar | Average weight (g) | Yield ($g\ m^{-2}$) | SPAD[z] | Leaf no. | Plant height (cm) | Leaf base to apex (cm) | Leaf length (cm) | Leaf width (cm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ‘New Veg-Gin’ | 19.1 c[y] | 405.9 d | 44.4 c | 6.5 ab | 27.38 d | 13.75 c | 10.37 bc | 9.56 b |
| ‘Green Delicacy’ | 15.2 d | 364.0 d | 46.0 c | 6.4 ab | 27.93 cd | 14.39 c | 9.81 c | 7.59 c |
| ‘Yi Jia’ | 31.7 a | 771.4 a | 51.5 a | 6.4 ab | 32.40 a | 18.35 a | 12.69 a | 10.65 a |
| ‘Lan Xing’ | 25.5 b | 632.1 b | 53.3 a | 6.2 ab | 27.76 cd | 14.87 c | 10.20 bc | 9.37 b |
| ‘Pan Chou Yeh Kale’ (Ming Feng) | 24.3 b | 526.9 bc | 48.4 b | 6.6 a | 29.01 bc | 14.58 c | 10.85 b | 9.35 b |
| ‘Pan Chou Yeh Kale’ (Gong Nong) | 19.8 c | 450.9 cd | 44.5 c | 6.1 b | 29.89 b | 16.65 b | 10.61 bc | 9.47 b |
| Block | NS[x] | NS | NS | NS | ** | *** | NS | * |
| Cultivar | *** | *** | *** | NS | *** | *** | *** | *** |

[z] SPAD: Soil and Plant Analyzer Development.
[y] Means of cultivars are averaged from 54 plants of 3 blocks; the same letters are not significantly different with least significant difference test at $P < 0.05$.
[x] NS, *, **, ***: Non-significant, significant at 0.05, 0.01, and 0.001 levels, respectively.

表 10. 太陽能板遮蔽率 40% 對不同品種油菜植株於營農型光電溫室生長之影響。

**Table 10**. Effects of 40% coverage (shading) of solar panel on the roof on the growth of different cultivars of rape (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *utilis*) grown in the photovoltaic greenhouse.

| Cultivar | Average weight (g) | Yield (g m$^{-2}$) | SPAD[z] | Leaf no. | Plant height (cm) | Leaf base to apex (cm) | Leaf length (cm) | Leaf width (cm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 'Yu Quan Cai Xin' | 16.4 bc[y] | 455 a | 39.03 bc | 7.2 a | 22.73 c | 12.81 a | 11.76 ab | 6.91 bc |
| 'Qing Long' | 22.9 a | 606 a | 40.83 b | 6.6 b | 27.87 ab | 10.74 b | 12.27 ab | 7.33 bc |
| 'All In' | 20.5 ab | 653 a | 34.47 d | 5.7 d | 27.06 ab | 9.13 bc | 11.73 ab | 8.91 a |
| Rape (Zheng, Xing-Tai) | 13.4 c | 457 a | 37.86 c | 6.0 cd | 26.28 b | 9.00 bc | 11.83 ab | 7.21 bc |
| 'Fu Lu Tian' | 14.9 c | 486 a | 45.44 a | 6.9 ab | 23.25 c | 8.83 c | 11.20 b | 6.51 c |
| Rape (Cheng Chi) | 20.0 ab | 632 a | 41.12 b | 6.5 bc | 26.85 ab | 10.22 bc | 12.56 a | 7.50 bc |
| Rape (Nian Feng) | 18.9 ab | 554 a | 37.14 c | 6.0 cd | 28.60 a | 10.38 bc | 12.93 a | 7.89 b |
| Block | * | NS[x] | ** | NS | NS | NS | ** | * |
| Cultivar | *** | NS | *** | *** | *** | *** | ** | *** |

[z] SPAD: Soil and Plant Analyzer Development.
[y] Means of cultivars are averaged from 60 plants of 3 blocks; the same letters are not significantly different with least significant difference test at $P < 0.05$.
[x] NS, *, **, ***: Non-significant, significant at 0.05, 0.01 and 0.001 levels, respectively.

表 11. 太陽能板遮蔽率 40% 對不同品種芥菜植株於營農型光電溫室生長之影響。

**Table 11**. Effects of 40% coverage (shading) of solar panel on the roof on the growth of different cultivars of mustard (*Brassica juncea* Coss.) grown in the photovoltaic greenhouse.

| Cultivar | Average weight (g) | Yield (g m$^{-2}$) | SPAD[z] | Leaf no. | Plant height (cm) | Leaf base to apex (cm) | Leaf length (cm) | Leaf width (cm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 'Xiao Yi' (Xin Yu Sen) | 22.1 bc[y] | 494.6 abc | 24.3 bcd | 5.2 ab | 23.21 b | 8.48 bc | 16.02 c | 6.40 cde |
| 'Tainung No.2' | 20.1 c | 504.4 abc | 27.2 a | 4.3 d | 31.08 a | 10.70 a | 17.47 b | 7.20 b |
| 'Tainung No.3' | 29.4 a | 813.0 a | 25.6 ab | 4.6 cd | 31.82 a | 9.69 ab | 21.81 a | 8.60 a |
| 'Qing He' | 24.2 b | 602.4 ab | 23.3 cde | 5.3 a | 24.27 b | 8.47 bc | 16.69 bc | 6.83 bc |
| 'Xiao Yi' (Jin Ri) | 19.9 c | 558.3 abc | 22.7 de | 4.8 bc | 22.97 b | 8.73 b | 16.12 c | 6.07 cde |
| 'Xiao Yi' (Hong Xin) | 22.7 bc | 626.8 ab | 22.7 de | 4.8 bc | 24.19 b | 8.81 b | 16.79 bc | 6.73 bcd |
| 'Ke Ren Yi' | 9.0 e | 244.9 c | 21.6 e | 3.5 e | 20.23 c | 7.27 cd | 12.96 d | 5.79 e |
| 'Xue Li Hong' | 13.9 d | 347.7 bc | 24.6 bc | 4.5 cd | 20.29 c | 6.50 d | 13.51 d | 6.04 de |
| Block | ** | NS[x] | * | NS | ** | NS | *** | *** |
| Cultivar | *** | NS | *** | *** | *** | *** | *** | *** |

[z] SPAD: Soil and Plant Analyzer Development.
[y] Means of cultivars are averaged from 60 plants of 3 blocks; the same letters are not significantly different with least significant difference test at $P < 0.05$.
[x] NS, *, **, ***: Non-significant, significant at 0.05, 0.01 and 0.001 levels, respectively.

人刈」單株重極低，僅 9 g (表 11)。此次試驗選用之小型葉用芥菜品種，由於農業統計年報無芥菜的項目，而農情報告資源網僅有大芥菜資料，以大芥菜單位面積 70% 產量為 1,592 g $m^{-2}$ 作參考。「台農三號」還有一半的產量需要達到，其他品種僅 244.9–626.8 g，與產量標準差異甚大。

營農型光電溫室內葉菜類從播種到採收之栽培時間，和一般露地栽培時間相當或些微延後。判斷園產品外觀，營農型光電溫室內部分葉菜有徒長或植株纖弱、不緊密的現象，離市場的接受標準還有進步空間。

作物間對光照的需求不盡相同，茄子、黃豆、花生和甘藷在遮蔭 30、47、63 及 73% 的情況下，產量及營養生長隨遮光程度增加而減少；在 30% 遮蔭下，唯獨秋作半結球萵苣產量顯著增加，且遮蔭程度達 47% 時，僅些微少於未遮光的對照組 (Wolff & Coltman 1989)。另茄果類與瓜果類蔬菜對光之需求較強，適合的光強度為 40 Klux (約 725 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$) 以上，而油菜、小白菜及青梗白菜等小葉菜類為光需求不敏感之作物，其光需求小於 10 Klux (約 181 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$)。Marrou *et al*. (2013) 研究指出，當光源縮限，萵苣具備有效提升生物量的能力，主要是透過增加葉片的光照擷取效率，其機制可能為 (1) 在葉片數減少的情況下，增加總葉面積；(2) 採行葉面積的重新分配，提高陰影下的葉面積到最大。本研究比較數種葉菜類，發現同屬十字花科葉菜，小白菜較油菜和青梗白菜適合在遮光的環境中生長，大部分的品種單位面積產量能達到農委會的七成標準；然而，如試驗中芥藍、油菜等葉菜，並無農業統計年報的數據，該以何種數據作為七成產量的依據標準較為恰當，仍需進一步商討，而以常態栽培生產之資料可作為選項。在營農型光電溫室下能栽培但無法達到產量標準的其他葉菜類，由本試驗結果之預估，後續則可透過適當密植或加強肥培管理等方式，來提高單位面積產量。

有機栽培系統對於作物生產的表現跟作物類型與品種有關。相較於慣行栽培，果樹 (-3%) 與產油作物 (-11%) 產量，並無統計上的顯著差異，然而有機生產的穀類 (-26%) 與蔬菜 (-33%) 產量則顯著較低 (Seufert *et al*. 2012)。而本試驗產量標準採農業統計年報，主要為慣行栽培，因此若試驗採用慣行方式生產，應該有增產的空間。

前人研究指出該個案有機農場之生產成本較慣行栽培農戶高 20.9%，但其種子費、肥料費及病蟲害防治費用等，均低於對照農戶，其銷售量與銷售額均高於損益平衡點，顯示存有一定的利潤 (Chen & Day 2009)。以穴盤育苗再定植田間 2–3 wk 後採收的方式運行，在營農型光電溫室內可以避免外界天氣變化造成的不確定因素，保障穩定生產，一年保守估計最少可以種植 10 作的葉菜。產量雖略低於網室栽培模式，但其複作指數高，為其不容忽視的特點。

本研究初步篩選在農電系統下能有效利用光照的蔬菜種類與品種，接下來會配合溫網室栽培的對照，希望能建立營農型光電溫室下之蔬菜栽培系統，提供未來農電產業發展參考。

## 誌謝

感謝行政院農業委員會提供 106 農科 -22.2.1- 農 -C1 研究計畫的經費支持，與向陽優能電力股份有限公司提供試驗場地及相關協助，使本研究可以順利執行。

## 引用文獻

Chen, S. F. and D. T. Day. 2009. A case study of organic vegetable farm operated achievement. Res. Bull. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Stn. 105:13–21. (in Chinese with English abstract)

Cantagallo, J. E., D. Medan, and A. J. Hall. 2004. Grain number in sunflower as affected by shading during floret growth, anthesis and grain setting. Field Crops Res. 85:191–202.

Dapoigny, L., S. de Tourdonnet, J. Roger-Estrade, M. H. Jeuffroy, and A. Fleury. 2000. Effect of nitrogen nutrition on growth and nitrate accumulation in lettuce (*Lactuca sativa* L.), under various conditions of radiation and temperature. Agronomie 20:843–855.

Department of Planning, Council of Agriculture. 2017. Practicing photovoltaic greenhouse in farming: No abusing of photovoltaic greenhouse to generate electricity and damaging prime farmlands. http://www.coa.gov.tw/theme_data.php?theme=news&sub_theme=agri&id=6892 (visited on 9/5/2017) (in

Chinese)

Dupraz, C., H. Marrou, G. Talbot, L. Dufour, A. Nogier, and Y. Ferard. 2011. Combining solar photovoltaic panels and food crops for optimising land use: Towards new agrivoltaic schemes. Renew. Energ. 36:2725–2732.

Kadowaki, M., A. Yano, F. Ishizu, T. Tanaka, and S. Noda. 2012. Effects of greenhouse photovoltaic array shading on Welsh onion growth. Biosyst Eng. 111:290–297.

Kitaya, Y., G. Niu, T. Kozai, and M. Ohashi. 1998. Photosynthetic photon flux, photoperiod, and $CO_2$ concentration affect growth and morphology of lettuce plug transplants. HortScience 33:988–991.

Marrou, H., J. Wery, L. Dufour, and C. Dupraz. 2013. Productivity and radiation use efficiency of lettuces grown in the partial shade of photovoltaic panels. Eur. J. Agron. 44:54–66.

Pan, R. C. 2013. Plant Physiology. 2nd ed. Yi Hsien Publishing. New Taipei, Taiwan. 367 pp. (in Chinese)

Seufert, V., N. Ramankutty, and J. A. Foley. 2012. Comparing the yields of organic and conventional agriculture. Nature. 485:229–232.

Tani, A., S. Shina, K. Nakashima, and M. Hayashi. 2014. Improvement in lettuce growth by light diffusion under solar panels. J. Agric. Meteorol. 70:139–149.

Wolff, X. Y. and R. R. Coltman. 1989. Productivity under shade in Hawaii of five crops grown as vegetables in the tropics. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115:175–181.

Yang, C. M. and C. Y. Lin. 2005. Chinese kale. p.371–376. *in*: Taiwan Agriculture Encyclopedia, Crop Edition 2. 3rd ed. (Hung, J. H., T. D. Fan, and L. N. Lin, eds.) Council of Agriculture. Taipei, Taiwan. 926 pp. (in Chinese)

# Growth Evaluation on Different Vegetable Species Grown in a Photovoltaic Greenhouse with 40% Coverage of Solar Panel on the Roof

Hsiang-I Lee[1], Shough-Peng Lee[2], Miao-Miao Hsu[1,*], and Hui-Ling Lo[1]

## Abstract

Lee, H. I., S. P. Lee, M. M. Hsu, and H. L. Lo. 2018. Growth evaluation on different vegetable species grown in a photovoltaic greenhouse with 40% coverage of solar panel on the roof. J. Taiwan Agric. Res. 67(3):258–269.

Due to the government paying much attention to the solar energy issue and eager to combine with agricultural production, agrivoltaic systems gain much attention recently. The objective of this study was to evaluate growth of different vegetable species and cultivars that suitable for winter cultivation in a photovoltaic greenhouse with 40% coverage of solar panel on the roof. Results showed that cultivars of Pak-Choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *communis*) 'Lü Guang No.1' and 'Oprah' had the best yield and flavor among others. For non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. spp), cultivars 'Quan Zhou Bai Cai', 'Mi Xue Er', 'Cui Feng', and 'E Zi Bai Cai No.503' performed the best. 'Qing Long', 'All In', and rape bred by Cheng Chi Seed Grower Company grew better within the tested cultivars of rape (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *utilis*). The yield of $F_1$ cultivars of Chinese kale (*Brassica oleracea* L. Alboglabra Group) 'Yi Jia' and 'Lan Xing' were significantly higher than others. Mustard (*Brassica juncea* Coss.) 'Tainung No.3' and 'Qing He' had the highest average weight and yield. Comparing vegetable species for the experiment, non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. spp) obtained 70% of the 3-year average yield of that grown in normal condition and can be harvested in about 16 d after transplanting, shorter than other vegetable species with high multi-cropping index. As a result, it is the most adaptable vegetable of this study. The vegetable species without acceptable yield production could be further enhanced by improved cultural practices.

**Key words:** Photovoltaic greenhouse, Coverage, Vegetable cultivation, Cultivar selection.

Received: September 19, 2017; Accepted: January 18, 2018.

[*] Corresponding author, e-mail: mmhsu@fthes-tari.gov.tw

[1] Assistant Research Fellows, Department of Vegetable, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

[2] Associate Research Fellow, Department of Vegetable, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(3):270–282 (2018)
DOI:10.6156/JTAR.201809_67(3).0004

研究報告

# 分蔥潛隱病毒親緣分析及應用巢式聚合酶鏈鎖反應作分群偵測

林玫珠 [1] 林羿廷 [2] 蔡錦慧 [2] 鄧汀欽 [3,*]

## 摘要

林玫珠、林羿廷、蔡錦慧、鄧汀欽。2018。分蔥潛隱病毒親緣分析及應用巢式聚合酶鏈鎖反應作分群偵測。台灣農業研究 67(3):270–282。

搜尋美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) GenBank 登錄之分蔥潛隱病毒種 (species *Shallot latent virus*; SLV) 分離株鞘蛋白基因核苷酸序列，進行親緣分析。本研究可將現有 SLV 分為 3 個分類群：第一群 (G1)、第二群 (G2)、第三群 (G3)。2015−2016 年間採集台灣的蔥屬植物樣品，進行酶聯抗體免疫分析 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 及反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)，檢出10株SLV。將其鞘蛋白基因核苷酸序列定序，其中 6 株 SLV 鞘蛋白基因核苷酸長度為 894 bp，屬於第一群 (G1)；另外 4 株鞘蛋白基因核苷酸長度為 885 bp，屬於第三群 (G3)。不同 SLV 之病毒株鞘蛋白基因核苷酸序列的相同度大於 74.3%，胺基酸序列相同度大於 84.4%。根據所分類的各群病毒鞘蛋白基因核苷酸序列之差異，設計個別的專一性引子，進行 RT-PCR，並配合巢式-聚合酶鏈鎖反應 (nested-polymerase chain reaction; nested-PCR)，可針對第一群 (G1) 病毒株增幅出 187 bp 的條帶，第二群 (G2) 病毒株增幅出 548 bp 的條帶，第三群 (G3) 病毒株增幅出 540 bp 的條帶。將 134 個經 RT-PCR 測得 SLV 的蔥科作物樣本進行上述的 nested-PCR，其中 52 個蒜球與 25 個蒜苗的病毒株中，分別有 51 個與 24 個病毒株為第一群；11 個韭菜的病毒株皆為第三群，其中有 9 個另有檢出第一群者；34 個青蔥的 SLV 中，有 5 株為第一群，19 株為第三群、15 株均有檢出第一群與第三群者。由本研究所檢測的台灣蔥科作物中，並無發現第二群的 SLV 存在。

**關鍵詞**：分蔥潛隱病毒、蔥科作物、親緣分析、巢式-聚合酶鏈鎖反應。

## 前言

台灣生產的蔥科作物主要有蔥 (*Allium fistulosum*)、洋蔥 (*A. cepa*)、韭 (*A. tuberosum*)、青蒜 (*A. sativum*) 及大蒜 (*A. sativum* L.) 等，根據 2015 年農委會的農業年報 (http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx)，蔥科作物的產量總計約 249,000 Mg，產值高達 87 億元以上。目前台灣感染蔥科作物的病毒有 8 種，於田間常發生交互感染，系統性感染的寄主經無性繁殖後使得病毒的傳播極為快速，繁殖幾代後，病毒病害發生率可達 100%。感染蔥科作物的病毒主要為 *Potyvirus* 屬的病毒種，如洋蔥黃萎病毒 (*Onion yellow dwarf virus*; OYDV)、韭蔥黃條斑紋病毒 (*Leek yellow stripe virus*; LYSV) 及分蔥黃條斑紋病毒 (*Shallot yellow stripe virus*; SYSV)，和 *Carlavirus* 屬的病毒種，如分蔥潛隱病毒 (*Shallot latent virus*; SLV)、大蒜潛隱病毒 (*Garlic latent virus*; GLV)、大蒜普通潛隱病毒 (*Garlic common latent virus*; GCLV) 及 Sint-Jan's 洋蔥潛隱病毒

投稿日期：2017 年 10 月 24 日。接受日期：2018 年 2 月 12 日。
* 通訊作者：tcde@tari.gov.tw
[1] 農業委員會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農業委員會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。
[3] 農業委員會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。

(*Sint-Jan's onion latent virus*; SjoLV)。若以無病毒繁殖體 (virus-free clones) 進行分蔥 (*Allium cepa* var. *ascalonicum* L.) 的生產，可提高 60% 的產量 (Ikeda & Imoto 1991)；而以不帶 SLV 的四季蔥為母株，將其組織培養繁植種苗種植於田間，其株高、單株重及莖徑均比受 SLV 感染的植株高 (Deng *et al*. 2003)，顯示病毒感染蔥科作物會影響其品質及產量。

SLV 於 1978 年首次在紐西蘭的分蔥植株上被發現，不感染大蒜，可感染蔥、韭蔥、分蔥等蔥屬作物，但無明顯病徵；SLV 感染紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*)、綠藜 (*C. murale*) 及奎藜 (*C. quinoa*)，產生局部病斑。SLV 可經由冬蔥瘤蚜 (*Myzus ascalonicus*) 媒介傳播，此 SLV 之熱不活化點 (thermal inactivation point; TIP) 為 80℃ (Bos *et al*. 1978)。1979 年，Lee *et al*. (1979) 在大蒜上發現同屬於 *Carlavirus* 的大蒜潛隱病毒 (GLV)，感染蠶豆造成系統性的壞疽病斑，在紅藜及奎藜上產生局部病斑，而感染番杏則產生黃化病斑，此 GLV 之熱不活化點 (TIP) 則介於 55−60℃之間。但根據 Van Dijk (1993) 進一步的研究報告指出，自紐西蘭分離的 SLV 與日本發現的 GLV，彼此血清的沉澱反應相同，寄主範圍的接種測試結果僅些微差異，故認為 GLV 即是其分蔥潛隱病毒的大蒜系統 (簡稱 SLV-G)。2005 年國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) 將感染大蒜的 GLV 正式歸類為 SLV (Fauquet *et al*. 2005)。

後來隨著分子生物技術的進步，Tsuneyoshi *et al*. (1998) 將中國、印度、紐西蘭、德國及台灣蔥科作物上的 SLV 與 GLV 進行鞘蛋白 (coat protein; CP) 基因核苷酸定序，發現 SLV 與 GLV 鞘蛋白基因核苷酸序列的相同度介於 89.2−99.3% 之間，更證實了 SLV 與 GLV 是相同的病毒。與其他國家已報導的 SLV 分離株相較下，由台灣蒜、韭、青蔥所分離的 SLV 分離株，其鞘蛋白的 N 端發生 3 個胺基酸缺失的現象，推測可能因為地理區隔產生的差異 (Tsuneyoshi *et al*. 1998)。因此，本研究試以分蔥潛隱病毒鞘蛋白基因核苷酸序列差異處設計專一性引子，對台灣蔥作物上的分蔥潛隱病毒進行調查，更進一步瞭解台灣的分蔥潛隱病毒是否真的有其區域性。

# 材料與方法

## 病毒的來源與保存

本研究以採自田間的白蒜、和美蒜、大片黑蒜、韭菜及青蔥等，以蒜球或葉片進行酶聯抗體免疫分析 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)，選取與本研究室製備之 SLV 抗血清 (Deng *et al*. 1991) 有正反應者，進行 SLV 病毒株的鑑定。其中，病毒株 SLV-GC、L2、S2 進行接種試驗，取 1 g 病組織加入 10 mL 0.05 M 磷酸緩衝溶液 ($K_2HPO_4$, pH 7.5) 研磨粗汁液，以機械接種於奎藜葉片，接種後 3−14 d 產生黃化局部病斑，連續 3 次單斑分離後之病毒株葉片，以 50% 甘油 (glycerol, SIGMA, St. Louis, MO, USA) 保存於-20℃，以供後續試驗進行。其中，SLV-GC、SLV-S2、SLV-S4、SLV-S33、SLV-ANG7、SLV-SH19 由青蔥分離的病毒株，SLV-L2 與 SLV-WF-L2 是由韭分離的病毒株，其餘 SLV 病毒株皆由白蒜、和美蒜或大片黑蒜所分離的病毒株，而 SLV-K 表示由韓國進口之大蒜分離的病毒株。

## 反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)

取 100 mg 罹病組織葉片或蒜瓣，以 RNA 純化試劑組 (Plant Total RNA Extraction Miniprep kit, Viogene, Sunnyvale, CA, USA) 萃取植物全量 RNA，RNA 保存於 -20℃備用。應用可增幅出包含 SLV 全長度鞘蛋白核酸序列之專一性引子對 CAR-V1 (5′-AA ACCTTTTG-GTTCACTTTAGG-3′) 與 CAR-CP3 (5′-GTATG-CAACTTAAATATAGCACGC-3′) (Tsuneyoshi *et al*. 1998) 進行 RT-PCR。RNA 先於 70℃變性 10 min 後置於冰上，反應以單步驟 RT-PCR 試劑 (AccuPower RT-PCR Premix, Bioneer, Daejeon, Korea) 進行，於總反應體積 20 μL 中，分別加入 1 μL RNA、各 1 μL 10 μM 的引子對及 17 μL 無菌水，於熱循環反應儀 Analytik Jena FlexCy-

cler2 (Life Science, Jena, Germany) 進行增幅。反應條件為 42℃進行反轉錄 60 min，95℃ 5 min 將反轉錄酶去活化，之後以 95℃ 30 $s^{-1}$、55℃ 30 $s^{-1}$、72℃ 1 $min^{-1}$ 共進行 35 個循環，最後於 72℃聚合反應 10 min。反應結果以 1.2% 洋菜瓊脂進行電泳分析。

## 核酸片段選殖與序列分析

取上述 RT-PCR 之產物 2 μL 與 yT&A 載體 (T&A cloning kit, Yeasten Biotech, Taipei, Taiwan) 進行黏合，之後轉型入 ECOS101 勝任細胞；以 M13 Forward 及 M13 Reverse 引子對進行 PCR 選殖，篩選含預期片段之選殖株，委由明欣生物科技公司 (Mission Biotech, Taipei, Taiwan) 以自動核酸定序儀進行核酸定序。所獲得之核酸序列以 DNASTAR Lasergene v13.1 分析套組 (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) 進行分析，其中 alignment 以 Clustal W 分析。並選用完整鞘蛋白核酸序列進行後續之親緣關係分析。

## 分蔥潛隱病毒株之鞘蛋白核苷酸親緣關係分析

搜尋美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 登錄之 SLV 病毒株鞘蛋白基因核苷酸序列，含完整鞘蛋白的病毒株共 51 株 (表 1)，分蔥潛隱病毒

**表 1.** 美國國家生物技術資訊中心登錄之分蔥潛隱病毒病毒株。
**Table 1.** List of isolates and accession numbers of SLV in GenBank of NCBI database.

| Isolate | Host | Country | Accession no. | Reference |
|---|---|---|---|---|
| CLC-1 | Chinese leek | Taiwan | AB004456 | Tsuneyoshi *et al*. (1998) |
| GC-2 | Garlic | Taiwan | AB004457 | Tsuneyoshi *et al*. (1998) |
| CLC-1 | Chinese leek | Japan | AB004458 | Tsuneyoshi *et al*. (1998) |
| WOC-2 | Welsh onion | Taiwan | AB004544 | Tsuneyoshi *et al*. (1998) |
| RC-1 | Rakkyo | Japan | AB004565 | Tsuneyoshi *et al*. (1998) |
| GNAG-9C2 | Garlic | Japan | AB004567 | Tsuneyoshi *et al*. (1998) |
| GCHI-3C1 | Garlic | China | AB004684 | Tsuneyoshi *et al*. (1998) |
| GUAE-13C1 | Garlic | UAE | AB004685 | Tsuneyoshi *et al*. (1998) |
| GI-3C2 | Garlic | Indonesia | AB004686 | Tsuneyoshi *et al*. (1998) |
| SI-4C2 | Shallot | Indonesia | AB004802 | Tsuneyoshi *et al*. (1998) |
| LI-3C1 | Leek | Indonesia | AB004803 | Tsuneyoshi *et al*. (1998) |
| GLVc | Garlic | China | AF314147 | unpublished (2000) |
| YH1 | Garlic | China | AJ292226 | Chen *et al*. (2001) |
| YH2 | Garlic | China | AJ292227 | Chen *et al*. (2001) |
| YH3 | Garlic | China | AJ292228 | Chen *et al*. (2001) |
| GarLV-HN | Garlic | China | AJ307034 | Chen *et al*. (2002) |
| GarLV-BJ | Garlic | China | AJ310199 | Chen *et al*. (2002) |
| GarLV-HB | Garlic | China | AJ409314 | Chen *et al*. (2002) |
| GarLV-JS | Garlic | China | AJ409315 | Chen *et al*. (2002) |
| GarLV-SD | Garlic | China | AJ409316 | Chen *et al*. (2002) |
| GarLV-YN | Garlic | China | AJ409317 | Chen *et al*. (2002) |
| GarLV-YN2 | Garlic | China | AJ409318 | Chen *et al*. (2002) |
| GarLV-YN3 | Garlic | China | AJ409319 | Chen *et al*. (2002) |
| GV-H | Garlic | Japan | D11161 | Tsuneyoshi & Sumi (1996) |
| GV1 | Garlic | Japan | D28591 | Nagakubo *et al*. (1994) |
| M77SEQLAST | Welsh onion | Japan | D73379 | unpublished (2002) |

表 1. 美國國家生物技術資訊中心登錄之分蔥潛隱病毒病毒株 (續)。

**Table 1.** List of isolates and accession numbers of SLV in GenBank of NCBI database. (continued)

| Isolate | Host | Country | Accession no. | Reference |
|---|---|---|---|---|
| GLV-K12 | Garlic | South Korea | DQ520093 | unpublished (2006) |
| Piraquara/PR | Garlic | Brazil | GU120175 | Mituti *et al*. (2011) |
| Sao Manuel/SP | Garlic | Brazil | GU120176 | Mituti *et al*. (2011) |
| cv. Morado | Garlic | Argentina | GU355922 | Torrico *et al*. (2010) |
| Sao Manuel/SP | Garlic | Brazil | HQ128602 | Mituti *et al*. (2011) |
| MS/SW/Aus2 | Garlic | Australia | HQ258896 | unpublished (2012) |
| WA-1 | Garlic | Australia | JF320811 | Wylie *et al*. (2012) |
| SW3 | Garlic | Australia | JQ899443 | unpublished (2012) |
| SG3 | Garlic | Spain | JX429966 | unpublished (2013) |
| AG2 | Garlic | Australia | JX429968 | unpublished (2012) |
| GLV-WH1 | Rakkyo | China | JX513400 | unpublished (2012) |
| GLV-WH2 | Rakkyo | China | JX513401 | unpublished (2012) |
| GLV-WH3 | Rakkyo | China | JX513402 | unpublished (2012) |
| GLV-WH4 | Rakkyo | China | JX513403 | unpublished (2012) |
| GLV-WH5 | Rakkyo | China | JX513404 | unpublished (2012) |
| GLV-WH6 | Rakkyo | China | JX513405 | unpublished (2012) |
| GLV-WH7 | Rakkyo | China | JX513406 | unpublished (2012) |
| GL200 | Garlic | Poland | KF862704 | Chodorska *et al*. (2014) |
| GL206 | Garlic | Poland | KF862705 | Chodorska *et al*. (2014) |
| GL207 | Garlic | Poland | KF862706 | Chodorska *et al*. (2014) |
| GL208 | Garlic | Poland | KF862707 | Chodorska *et al*. (2014) |
| GL210 | Garlic | Poland | KF862708 | Chodorska *et al*. (2014) |
| 292 | Garlic | Poland | KF862709 | Chodorska *et al*. (2014) |
| 410 | Garlic | Poland | KF862710 | Chodorska *et al*. (2014) |
| Wonju | Garlic | Korea | Z68502 | unpublished (1996) |
| SLV-GC | Garlic | Taiwan | MF776508 | Lin *et al*. (2015) |
| SLV-L2 | Chinese leek | Taiwan | MF776509 | Lin *et al*. (2015) |
| SLV-S2 | Green onion | Taiwan | MF776510 | Lin *et al*. (2015) |
| SLV-S4 | Green onion | Taiwan | MF776511 | Lin *et al*. (2015) |
| SLV-S33 | Green onion | Taiwan | MF776512 | Lin *et al*. (2015) |
| SLV-20Y-7 | Garlic | Taiwan | MF776513 | Lin *et al*. (2015) |
| SLV-3G-9 | Garlic | Taiwan | MF776514 | Lin *et al*. (2015) |
| SLV-shen | Garlic | Taiwan | MF776515 | Lin *et al*. (2015) |
| SLV-SH19 | Green onion | Taiwan | MF776519 | Deng *et al*. (2016) |
| SLV-23-7-1 | Garlic | Taiwan | MF776523 | Lin *et al*. (2015) |
| SLV-K1-9 | Garlic | Korea | MF776525 | Lin *et al*. (2015) |
| SLV-K2-10 | Garlic | Korea | MF776526 | Lin *et al*. (2015) |
| SLV-K4-10 | Garlic | Korea | MF776530 | Lin *et al*. (2015) |
| SLV-K5-9 | Garlic | Korea | MF776528 | Lin *et al*. (2015) |
| SLV-KF8 | Garlic | Korea | MF776529 | Lin *et al*. (2015) |

株之親緣關係以 DNASTAR Lasergene v13.1 分析套組 (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) 之 MEGA7.0 進行分析，親緣關係演化樹以 Neighbor-joining 與 Boot-strap resampling 分析，其中 bootstrap values 由 1,000 重複取樣計算獲得。

### 巢式-聚合酶鏈鎖反應 (Nested-polymerase chain reaction; nested-PCR)

依據分蔥潛隱病毒鞘蛋白基因核苷酸序列 multiple alignment 結果，分別針對不同的分類群設計專一性引子對，第一群 (G1) 的專一性引子對為 SLVcpG1-up 與 SLVcpG1-dw，第二群 (G2) 的專一性引子對為 SLVcpG2-up 與 SLVcpG2-dw，而第三群 (G3) 的專一性引子對為 SLVcp-tw1 與 SLVcp-tw2，引子對序列詳如表 2。取經由 CAR-V1/CAR-CP3 引子對進行 RT-PCR 後之產物 2 μL，以無菌水稀釋為 50× 後成為本巢式-聚合酶鏈鎖反應的模板。巢式-聚合酶鏈鎖反應的反應體積為 20 μL，分別加入 1 μL RT-PCR 產物稀釋液、2 μL 10× PCR Buffer、1.6 μL dNTP、各 1 μL 10 μM 的引子對及 13.6 μL 無菌水，最後加入 0.1 μL Takara Taq DNA polymerase (Takara Bio USA, Inc., Santa Cruz, CA, USA)，於熱循環反應儀 Analytik Jena FlexCycler2 (Life Science, Jena, Germany) 進行增幅。反應條件為 95℃變性 5 min，之後以 95℃ 15 $s^{-1}$、55℃ 15 $s^{-1}$、72℃ 1 $min^{-1}$ 共進行 35 個循環，最後於 72℃聚合反應 10 min。反應結果以 1.2% 洋菜瓊脂電泳進行分析。

### 核酸片段選殖與序列分析

取 2 μL RT-PCR 產物與 yT&A 載體 (T&A cloning kit, Yeasten Biotech, Taipei, Taiwan) 進行黏合，之後轉型入 ECOS101 勝任細胞；以 M13 Forward 及 M13 Reverse 引子對進行 PCR 選殖，篩選含預期片段之選殖株，委由明欣生物科技公司 (Mission Biotech, Taipei, Taiwan) 以自動核酸定序儀進行核酸定序。所獲得之核酸序列以 DNASTAR Lasergene v13.1 分析套組 (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) 進行分析，其中 alignment 以 Clustal W 分析。

### 分蔥潛隱病毒株之親緣關係分析

搜尋 NCBI 登錄之 SLV 病毒株鞘蛋白基因核苷酸序列，含完整鞘蛋白的病毒株共 51 株 (表 1)，分蔥潛隱病毒株之親緣關係以 DNASTAR Lasergene v13.1 分析套組 (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) 之 MEGA7.0 進行分析，親緣關係演化樹以 Neighbor-joining 與 Boot-strap resampling 分析，其中 bootstrap values 由 1,000 重複取樣計算獲得。

## 結果

### 分蔥潛隱病毒株之鞘蛋白核苷酸親緣關係分析

以引子對 CAR-V1 及 CAR-CP3 對大蒜、蔥及韭等病株 RNA 進行單步驟反轉錄 - 聚合酶鏈鎖反應 (one-step RT-PCR)，來自不同分離株所獲得的核酸片段大小約介於 940−1,140 bp 之間，其中包含 885 bp 或 894 bp 的鞘蛋白核苷酸序列，可分別轉譯 294 或 297 個胺基酸。本研究完成定序者共 10 個分離株，均已登錄於 NCBI GenBank 獲得登錄序號 (accession number)，詳如表 1。

以 MEGA7.0 對本研究之各病毒株和 GenBank 上已有之 SLV 鞘蛋白核苷酸進行相同度分析 (表 1、圖 1)，不同 SLV 分離株鞘蛋白核苷酸

**表 2.** 分蔥潛隱病毒分類群的專一性引子對序列。
**Table 2.** Sequences of group specific primer pairs of SLV.

| Group | Primer | Sequence | Product |
|---|---|---|---|
| Group 1 | SLVcpG1-up | AACAGAKTGAAGAAYTTGCCC | 187 bp |
| | SLVcpG1-dw | GTCACATTWATGCTAGATAATT | |
| Group 2 | SLVcpG2-up | AGTAACGTGCAGAAMTTGCCG | 548 bp |
| | SLVcpG2-dw | AGCGRGCAGACTTGSCGCAA | |
| Group 3 | SLVcp-tw1 | AACTCRGTAASTTGCCGACTCGC | 540 bp |
| | SLVcp-tw2 | ACGGCAAAATTGKCGCAGWGTMG | |

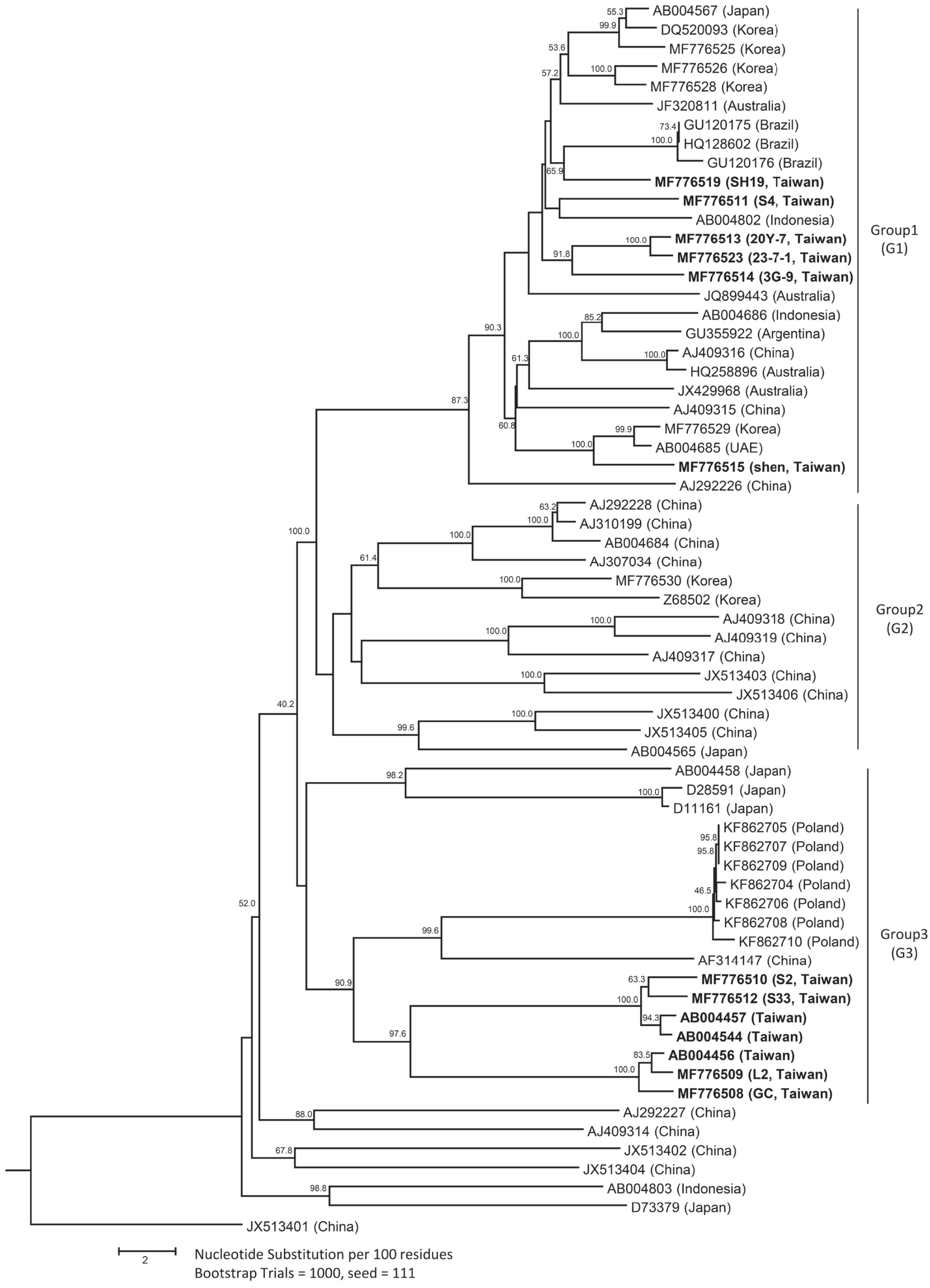



**圖 1.** 分蔥潛隱病毒株鞘蛋白核苷酸之親緣分析。

**Fig. 1.** Phylogenetic analysis of coat protein gene of *Shallot latent virus*.

序列之相同度大於 74.3%，胺基酸序列相同度大於 84.4%。

本研究依據鞘蛋白基因核苷酸序列可將 SLV 分為三群：第一群 (G1) 有 26 個病毒株，分屬於 9 個不同國家，彼此間核苷酸之相同度介於 86.2−99.1%，胺基酸相同度介於 93.6−100.0%。其中，台灣分離株 SLV-SH19 (MF776519)、S4 (MF776511)、20Y-7 (MF776513)、23-7-1 (MF776523)、3G-9 (MF776514) 與印尼的病毒株 AB004802 較為相近 (圖 1)；鞘蛋白的第 9、24 與 62 個胺基酸為第一群病毒株特有之高度保留區，分別為天門冬醯酸 (asparagine, N)、天門冬胺酸 (aspartic acid, D) 與胺基丙酸 (alanine, A) (圖 2)。第二群 (G2) 的 14 個病毒株中，11 個來自於中國大陸，2 個分離自韓國，1 個從日本分離的，核苷酸序列之相同度介於 76.4–98.4%，胺基酸的相同度介於 90.9–100.0%；其中，第 10、12、61 與 115 個胺基酸為第二群病毒株特有之高度保留位置，分別為天門冬醯酸、麩胺酸醯胺 (glutamine, Q) 與二個甲硫胺酸 (methionine, M) (圖 2)。

而第三群 (G3) 之核苷酸相同度由 76.4–99.8%，3 個日本的病毒株歸於第一亞群，7 個波蘭與 1 個中國的病毒分離株歸於第二亞群，7 個台灣分離的病毒株 SLV-GC (MF776508)、SLV-L2 (MF776509)、SLV-S2 (MF776510)、SLV-S33 (MF776512) 與 1999 年分離之 CLC-1 (AB004446)、GC-2 (AB004457)、WOC-2 (AB004544) 同屬於第三亞群，而且自成一群 (圖 1)。其中，第二亞群與第三亞群的鞘蛋白基因，比第一、二群的病毒株少了 9 個核苷酸，位於第 29 到第 37 個鹼基位置上；在第三群特有之高度保留位置為第 29、51、151、185 與 190 個胺基酸，是為精胺酸 (arginine, R)、天門冬胺酸、胺基丙酸、息寧胺酸 (threonine, T) 與苯丙胺酸 (phenylalanine, F)，其次之保留位置為第 3、30、36 與 67 個胺基酸，為離胺酸 (lysine, K)、息寧胺酸、異白胺酸 (isoleucine, I) 與纈胺酸 (valine, V) (圖 3)。而為了區別台灣的病毒株，分別設計第一、二群及第三群之專一性引子，以分析田間分蔥潛隱病毒的發生。

## 巢式-聚合酶鏈鎖反應進行 SLV 之分群分析

針對 SLV 不同的分類群設計專一性引子對 (表 2)，將上述經核苷酸定序確定之產物進行巢式 - 聚合酶鏈鎖反應，第一群 (G1) 的專一性引子對為 SLVcpG1-up 與 SLVcpG1-dw，第二群 (G2) 的專一性引子對為 SLVcpG2-up 與 SLVcpG2-dw，而第三群 (G3) 的專一性引子對為 SLVcp-tw1 與 SLVcp-tw2，預期可增幅出 187 bp、548 bp 及 540 bp 的專一性條帶。對田間樣本進行分析，結果顯示，病毒株 SLV-S4、SLV-SH19、SLV-4B-3 及 SLV-3G-9 能增幅出約 187 bp 的條帶，經定序分析確實屬於第一群；而病毒株 SLV-L2、SLV-S2、SLV-S33 及 SLV-WF-L2 僅在引子對 SLVcp-tw1 與 SLVcp-tw2 增幅時，獲得一 540 bp 的條帶，經選殖定序證實為第三群之序列無誤；而樣本 SLV23-7-1 同時可檢出 G1 與 G3 二種分類群的核酸條帶，由韓國進口蒜球所獲得的病毒株 SLV-K4-10 則可檢出 G1、G2 與 G33 種分類群的核酸條帶 (圖 4)。由上述結果證實，本研究針對分蔥潛隱病毒不同的分類群所設計的專一性引子對，能準確地應用於 SLV 鞘蛋白核苷酸分類群的鑑別。

## 台灣發生之分蔥潛隱病毒分類群之調查

將 RT-PCR 檢測出的 134 個具有 SLV 的植株，以上述 3 組 SLV 分類群的引子對，對台灣田間的蔥屬作物進行 nested-PCR 檢測，包含 11 個韭菜、77 個大蒜、12 個洋蔥及 34 個青蔥樣本。結果顯示，有 111 株屬於第一分類群的病毒株，有 50 株為第三分類群，同時複合感染第一及第三分類群的植株共計有 30 株；而截至目前，在台灣尚未分離到第二群的病毒株 (表 3)。依作物來看，大蒜的部分，無論是蒜球或蒜苗有 96% 感染第一群的 SLV，僅 9% 同時複合感染第一與第三群的 SLV；然在韭菜與青蔥的部分，感染第三群 SLV 的機會高於第一群，感染率分別為 53% 與 93%，韭菜有 9 株為複合感染，青蔥有 12 株為複合感染 (表 3)。所檢測 15 個南韓進口蒜頭，15 個都帶有第一群的 SLV，其中 1 個複合感染第二群病毒株 (資料未顯示)。

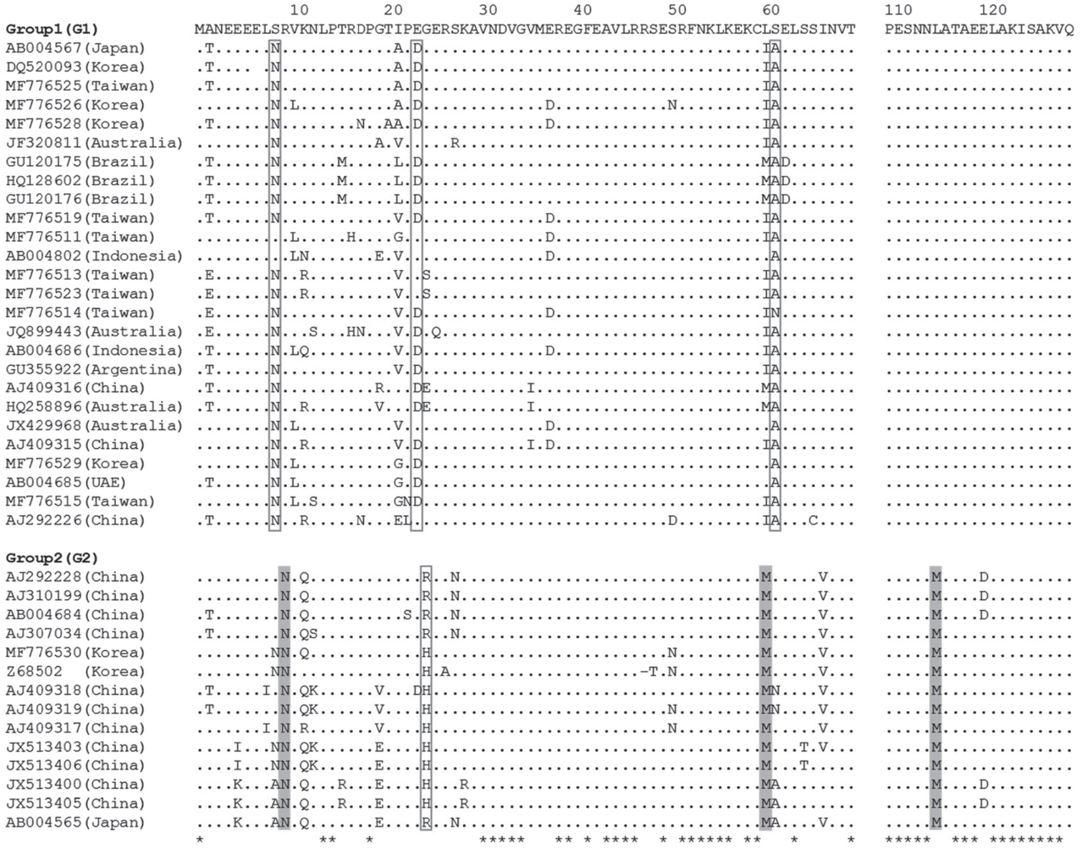



**圖 2.** 分蔥潛隱病毒分類群 G1 與分類群 G2 鞘蛋白胺基酸序列之差異。* 所有分蔥潛隱病毒的鞘蛋白保留序列。陰影方框表示高度保留區；實線方框表示次要保留區。

**Fig. 2.** Divergence of coat protein amino acid sequences between group 1 (upper 26 isolates) and group 2 (lower 14 isolates) of *Shallot latent virus*. The amino acids conserved in all SLV sequences are highlighted with asterisks. Solid line box: highly conserved; dotted line box: secondary conserved.

## 討論

Bos *et al*. (1978) 首次從分蔥植株分離出分蔥潛隱病毒 (SLV)，雖然在分蔥植株上無明顯病徵，但其可感染紅藜、奎藜產生局部壞疽病斑。隨後 Lee *et al*. (1979) 自大蒜分離出一株 *Carlavirus*，回接大蒜仍僅造成無病徵系統性感染，定名為大蒜潛隱病毒 (GLV)。直到 Van Dijk (1993) 對二者進行抗血清交叉反應測試，發現二者之血清與病毒株可相互反應，因此依血清學之關係認定二者皆為分蔥潛隱病毒，進而將日本學者 Lee *et al*. (1979) 由大蒜上分離的病毒株重新定名為分蔥潛隱病毒大蒜分離株 (SLV-G strain)。繼此，Tsuneyoshi *et al*. (1998) 以分子生物技術進行該等病毒之鞘蛋白核苷酸序列分析，結果顯示在蔥科作物上分離的 SLV 與 GLV 之鞘蛋白基因相同度介於 89.6−98.0%，再次證實二者應屬相同病毒。依據 2011 年 ICTV 的定義，鞘蛋白核苷酸序列高於 72%，胺基酸序列高於 80% 屬於同一個 *Calarvirus* 的種 (Hammond 2012)。將本研究 2015 年所登錄的台灣 10 個 SLV 分離株，與 GenBank 上已登錄之 SLV 和 GLV 分離株進行親緣分析，不同分離株之鞘蛋白核苷酸序列之相同度大於 74.3%，胺基酸序列相同度大於 84.4%，依據 ICTV 定義，此等分離株應屬 SLV 成員。

在 2015–2016 年由台灣蔥科作物分離之 SLV 行鞘蛋白核苷酸定序，並與目前 GenBank

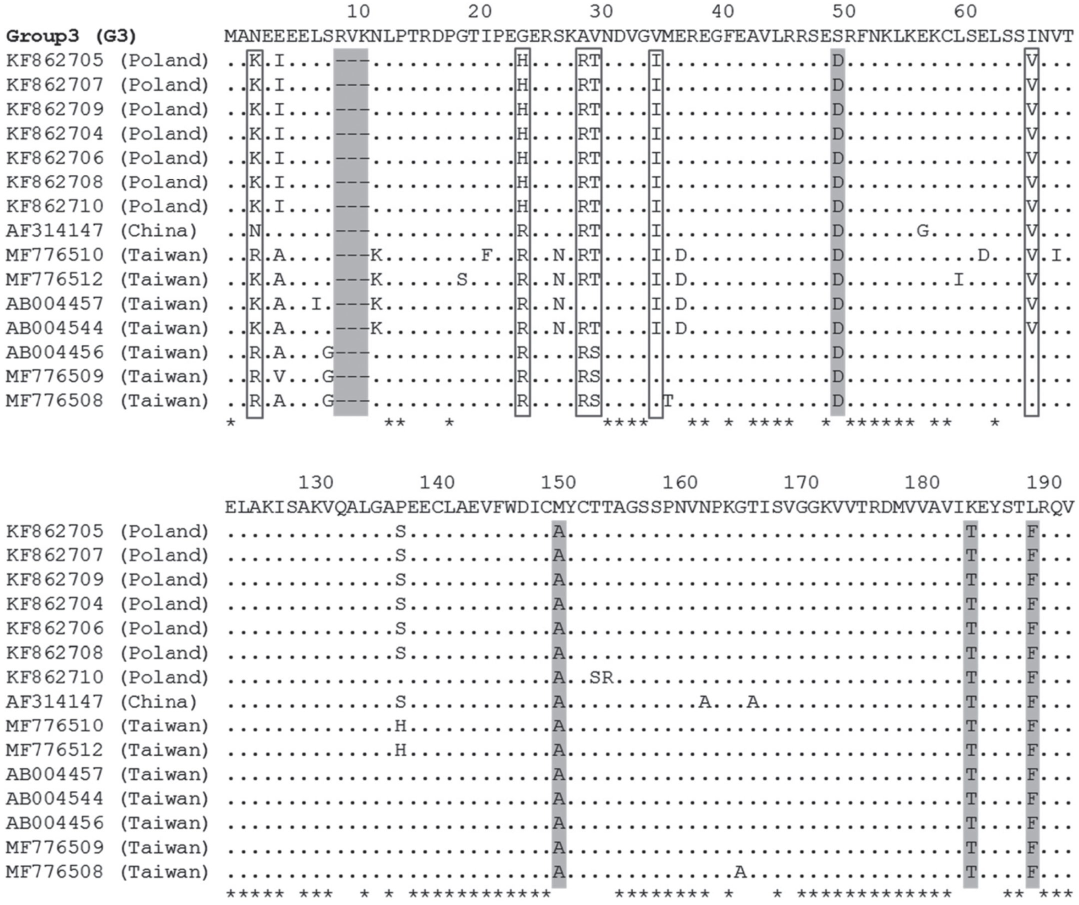



**圖 3.** 分蔥潛隱病毒鞘蛋白分類群 G3 胺基酸之差異。* 所有分蔥潛隱病毒的鞘蛋白保留序列。陰影方框表示高度保留區；實線方框表示次要保留區。

**Fig. 3.** Distinction of coat protein amino acid sequences of group 3 of *Shallot latent virus*. The amino acids conserved in all the sequences are highlighted with asterisks. Solid line box: highly conserved; dotted line box: secondary conserved.

登錄之所有 SLV 病毒株進行比對分析，發現由青蔥分離株 SH19 (MF776519)、S4 (MF776511) 和大蒜分離株 20Y-7 (MF776513)、23-7-1 (MF776523)、3G-9 (MF776514) 與印尼分離株 SI-4C2 (AB004802) 的親緣關係相近，其核酸相同度介於 90.7–91.8%，鞘蛋白核苷酸長度為 894 bp，歸屬於演化樹中的第一分類群。另外，台灣青蔥分離株 S2 (MF776510)、S33 (MF776512) 及韭菜分離株 L2 (MF776509)、大蒜分離株 GC (MF776508)，與 Tsuneyoshi *et al*. (1998) 自台灣分離的 CLC-1 (AB004456)、GC-2 (AB004457)、WOC-2 (AB004544) 自成一群，歸屬於第三分類權的第三亞群，與波蘭的病毒株較為相近，其鞘蛋白核苷酸度為 885 bp、轉錄 295 個胺基酸，比第一、二分類群少了 9 個核苷酸、3 個胺基酸。Tsuneyoshi *et al*. (1998) 認為這 9 個核苷酸的缺失，可能是由於台灣經地理隔閡所造成分蔥潛隱病毒的變異。然而，根據本研究的調查，台灣現有的病毒株除了 1998 年分離的第三群病毒株外，大部分已轉變為第一分類群之病毒株，尤其是大蒜上面的病毒株，有 96% 為第一分類群。這很有可能與過去國內大蒜產量不足，曾以進口大蒜因應，使大蒜上之病毒發生轉變。在韭菜與青蔥上的病毒株則分別還有 53% 與 93% 為

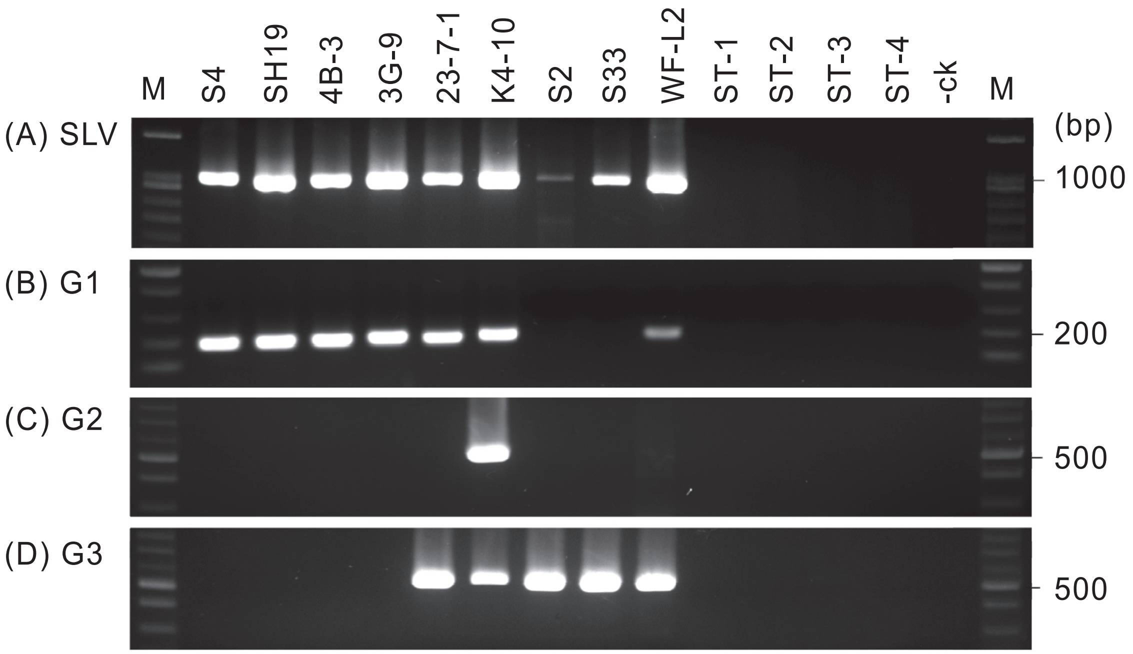



**圖 4.** 分蔥潛隱病毒鞘蛋白基因之分群測試。(A) 應用反轉錄 - 聚合酶鏈鎖反應檢出 SLV 陽性反應的分離株 S4、SH19、4B-3、3G-9、23-7-1、K4-10、S2、S33、WF-L2；(B) (C) (D) 應用巢式-聚合酶鏈鎖反應進一步分別鑑別出分類群 G1、G2、G3。

**Fig. 4.** Grouping tests of coat protein genes of shallot latent virus. SLV isolates (S4, SH19, 4B-3, 3G-9, 23-7-1, K4-10, S2, S33, and WF-L2) were identified by RT-PCR (A), and then separately detected by nested-PCR. SLV isolates of group 1 (G1) were showed in (B), group 2 (G2) in (C), and group 3 (G3) in (D).

**表 3.** 以巢式-聚合酶鏈鎖反應法進行台灣分蔥潛隱病毒鞘蛋白基因核苷酸分類群的調查結果。

**Table 3.** Nested-PCR based survey of SLV grouping by nucleotide sequences of coat protein gene in Taiwan.

| Host | Source | No. of SLV | No. of grouping | | | Complex infecting |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Group 1 | Group 2 | Group 3 | |
| Chinese leek | Wufeng Dist. | 11 | 9 | 0 | 11 | 9 |
| Garlic bulb | Wufeng Dist. | 20 | 20 | 0 | 0 | 0 |
| | Wufeng Dist. | 16 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| | Mailiao Township | 4 | 4 | 0 | 1 | 1 |
| | Xiluo Township | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 |
| | Wufeng Dist. | 9 | 9 | 0 | 2 | 2 |
| Garlic green | Wufeng Dist. | 3 | 3 | 0 | 1 | 1 |
| | Sanxing Township | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| | Ren'ai Township | 14 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| Onion | Yilan City | 12 | 12 | 0 | 1 | 1 |
| Welsh onion | Wufeng Dist. | 9 | 9 | 0 | 9 | 9 |
| | Yilan City | 13 | 2 | 0 | 13 | 2 |
| | Yilan City | 12 | 4 | 0 | 9 | 1 |
| Total | | 134 | 111 | 0 | 50 | 30 |

第三群的分離株，確實有其地理上的區隔，產生台灣特有的 SLV 病毒株族群。

過去，RT-PCR 配合 nested-PCR 被應用於檢測低濃度或是標的基因不穩定的植物病毒樣本，或是為避免汙染而再一次確認檢測結果的正確性 (Jeong *et al*. 2014)。例如 Lee *et al*. (2015, 2016) 應用 RT-PCR 與 nested-PCR 技術於檢疫病毒的確認，包含菸草輪班病毒 (*Tobacco ringspot virus*) 及桃叢簇花葉病毒 (*Peach rosette mosaic virus*)。而本文卻是應用 RT-PCR 配合 nested-PCR 進行 *Shallot latent virus* 種內差異的分析，並將 SLV 的病毒株分成為三群。

雖然研究報告指出 SLV 與 SLV-G 僅在寄主範圍有些微的差異表現 (Van Dijk 1993)，然而二者的熱不活化點 (TIP) 確有著明顯的差異。由 Bos *et al*. (1978) 分離的 SLV 其熱不活化點為 80℃，但 Lee *et al*. (1979) 分離之 SLV-G 的熱不活化點卻為 55−60℃，與 Deng *et al*. (1991) 自北蒜分離的 SLV-G 相同。未來將探討鞘蛋白核苷酸序列之差異，與其鞘蛋白的耐熱性或熱穩定性的關係。

## 引用文獻


Bos, L., H. Huttinga, and D. Z. Maat. 1978. *Shallot latent virus*, a new carlavirus. Neth. J. Plant Path. 84:227–237.

Chen, J., J. Chen, and M. J. Adams. 2001. Molecular characterization of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. Arch. Virol. 146:1841–1853.

Chen, J., J. P. Chen, and M. J. Adams. 2002. Characterization of some carla- and potyviruses from bulb crops in China. Arch. Virol. 147:419–428.

Chodorska, M., E. Paduch-Cichal, E. Kalinowska, and M. S. Szyndel. 2014. First report of *Onion yellow dwarf virus*, *Garlic common latent virus* and *Shallot latent virus* on garlic in Poland. Plant Dis. 98:858.

Deng, T. C., J. Y. Liao, and H. Y. Yang. 2003. The incidence of *Shallot latent virus* and its effect on the growth of green onion in Yilan area. Plant Pathol. Bull. 12:191–198. (in Chinese with English abstract)

Deng, T. C., S. W. Tsai, and T. W. Tsai. 1991. Occurrence of *Garlic latent virus* in Taiwan and its biological characterization. J. Taiwan Agric. Res. 40:333–345. (in Chinese with English abstract)

Deng, T. C., Y. T. Lin, M. J. Lin, C. T. Chen, C. M. Chou, and C. H. Liu. 2016. Feasibility study of backtracking origins of garlic bulbs by phylogenetic characteristics of *Shallot latent virus* in the garlic. J. Plant Medicine 58:98–99. (in Chinese)

Fauquet, C. M. and M. A. Mayo. 2005. Y, genus: *Garlavirus*. p.1101–1105. *in*: Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball, eds.). Academic Press, MA. 1162 pp.

Hammond, J. 2012. Create three new species in the genus *Calarvirus*, family *Betaflexiviridae*. https://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/plant-official/4449. (visit on 2/19/2013)

Ikeda, Y. and M. Imoto. 1991. Production of virus-free plants of *Allium wakegi* Araki by means of shoot apex culture and its efficiency. Bull. Hiroshima Prefectural Agric. Expt. Station 54:41–46.

Jeong, J. J., H. J. Ju, and J. J. Noh. 2014. A review of detection methods for the plant viruses. Res. Plant Dis. 20:173–181.

Lee, S., G. Lee, I. C. Choi, and J. Y. Rho. 2015. Development of PCR diagnostic system for detection of the seed-transmitted *Tobacco ringspot virus* in quarantine. Indian J. Microbiol. 55:231–233.

Lee, S., C. S. Kim, Y. G. Shin, J. H. Kim, Y. S. Kim, and W. H. Jheong. 2016. Development of nested PCR-based specific markers for detection of *Peach rosette mosaic virus* in plant quarantine. Indian J. Microbiol. 56:108–111.

Lee, Y. W., S. Yamazaki, T. Osaki, and T. Inouye. 1979. Two elongated viruses in garlic, *Garlic latent virus* and *Garlic mosaic virus*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 45:727–734.

Lin, M. J., C. T. Chen, Y. H. Chien, T. C. Deng, C. M. Chou, and C. H. Liu. 2015. Phylogenetic analysis of coat protein gene of *Shallot latent virus*. Plant Pathol. Bull. 24:153. (in Chinese)

Mituti,T., J. M. Marubayashi, M. F. Moura, R. Krause-Sakate, and M. A. Pavan. 2011. First report of *Shallot latent virus* in garlic in Brazil. Plant Dis. 95:227.

Nagakubo, T., M. Kubo, and K. Oeda. 1994. Nucleotide sequences of the 3' regions two major viruses from mosaic-diseased garlic: Molecular evidences of mixed infection of a potyvirus and a carlavirus. Phytopathology 84:640–645.

Torrico, A. K., E. E. Cafrune, and V. C. Conci. 2010. First report of *Shallot latent virus* in garlic in Argentina. Plant Dis. 94:915.

Tsuneyoshi, T. and S. Sumi. 1996. Differentiation among

garlic viruses in mixed infections based on RT-PCR procedures and direct tissue blotting immunoassays. Phytopathology 86:253–259.

Tsuneyoshi, T., T. Matsumi, T. C. Deng, I. Sako, and S. Sumi. 1998. Differentiation of *Allium* carlaviruses isolated from different parts of the world based on the viral coat protein sequence. Arch. Virol. 143:1093–1107.

Van Dijk, P. 1993. Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. Neth. J. Plant Pathol. 99:233–257.

Wylie, S. J., H. Luo, H. Li, and M. G. Jones. 2012. Multiple polyadenylated RNA viruses detected in pooled cultivated and wild plant samples. Arch. Virol. 157:271–284.

# Phylogenetic Analysis and Grouping Detection of Species *Shallot latent virus* by Nested-PCR

Mei-Ju Lin[1], Yi-Ting Lin[2], Chin-Hui Tsai[2], and Ting-Chin Deng[3,*]

## Abstract

Lin, M. J., Y. T. Lin, C. H. Tsai, and T. C. Deng. 2018. Phylogenetic analysis and grouping detection of species *Shallot latent virus* by nested-PCR. J. Taiwan Agric. Res. 67(3):270–282.

The coat protein (CP) gene nucleotide sequences of species *Shallot latent virus* (SLV) collected from National Center for Biotechnology Information (NCBI)-GenBank database were tested for phylogenetic analysis. All the current SLV isolates tested were clustered into three groups: G1, G2 and G3. In 2015–2016, a total of 10 SLV-infected *Allium* materials were collected from a survey of SLV occurred in Taiwan by detecting the virus with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The CP genes of each isolates were cloned and sequenced, among 10 isolates tested, 6 isolates were clustered into G1 with 894 bp nucleotides. The others belong to G3 with 885 bp nucleotides of CP gene. Based on divergence of CP nucleotide sequences, the group specific primer pairs were designed to differentiate the groups. Following by a RT-PCR, the nested-polymerase chain reaction (nested-PCR) was performed, and the amplified DNA was 187 bp, 548 bp and 540 bp for G1, G2 and G3, respectively. Accordingly, 134 SLV-infected samples were collected and detected by RT-PCR and nested-PCR as described above. There were 51 out of 52 garlic bulbs and 24 out of 25 garlic plants were identified as G1. Moreover, a total of 11 samples from Chinese leeks were defined as G3, and 9 samples out of them were complex with G1 and G3. The other 34 samples tested from green onions were consisted of 5 belonged G1, 19 belonged G3 and 15 were complex with G1 and G3. In this study, no SLV isolates belonged G2 were found from *Allium* in Taiwan.

**Key words:** *Shallot latent virus*, *Allium* species, Phylogenetic analysis, Nested-polymerase chain reaction.

Received: October 24, 2017; Accepted: February 12, 2018.
* Corresponding author, e-mail: tcde@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Research Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(3):283–291 (2018)
DOI:10.6156/JTAR.201809_67(3).0005

研究報告

# 評估水楊酸甲酯對捕食性天敵的誘引效果

董耀仁[1]　許北辰[1,*]

## 摘要

董耀仁、許北辰。2018。評估水楊酸甲酯對捕食性天敵的誘引效果。台灣農業研究 67(3):283–291。

本試驗於 2015–2016 年間，以黃色黏板搭配不同濃度的水楊酸甲酯，於行政院農業委員會農業試驗所果園區進行調查可誘捕到的捕食性天敵種類。試驗結果顯示，水楊酸甲酯處理組較對照組顯著誘引瓢蟲科 (Coccinellidae，99、10 及 0.1% 水楊酸甲酯處理組全年調查)、草蛉科 (Chrysopidae，10、1 及 0.1% 水楊酸甲酯處理組全年調查)、食蚜蠅科 (Syrphidae，99、0.1 及 0.01% 水楊酸甲酯處理組夏季調查)、花蝽科 (Anthocoridae，所有水楊酸甲酯處理組全年調查)、盲蝽科 (Miridae，99、10、0.1 及 0.01% 水楊酸甲酯處理組全年調查) 及隱翅蟲科 (Staphylinidae，99% 水楊酸甲酯處理組春季調查) 捕食性天敵。但水楊酸甲酯對捕食性天敵的誘引效果，取決於施用濃度，而且捕食性天敵對水楊酸甲酯的反應存在季節差異性。

**關鍵詞**：水楊酸甲酯、捕食性天敵、生物防治。

## 前言

水楊酸甲酯 (methyl salicylate) 又名冬青油 (wintergreen oil) 是一種酚類類化合物 (phenolic compound)，前人研究中水楊酸甲酯參與植物防禦反應以對抗病原及植食昆蟲。水楊酸甲酯經由水楊酸合成路徑活化後，液態水楊酸甲酯累積於植物體內，隨後高濃度的氣態水楊酸甲酯釋放於空氣中 (Shulaev *et al*. 1997; Kessler & Baldwin 2001, 2002; Park *et al*. 2007; Vlot *et al*. 2008)。

目前已知至少 10 種以上作物受害蟲/蟎危害時會釋放水楊酸甲酯，其中包括：萊豆受二點葉蟎 (*Tetranychus urticae* Koach) 危害 (Dicke *et al*. 1990)、番茄受二點葉蟎危害 (Dicke *et al*. 1998)、苦瓜受二點葉蟎危害 (Agrawal *et al*. 2002)、甘藍遭受紋白蝶 (*Pieris* spp.) 危害 (Geervliet *et al*. 1997)、梨遭受木蝨科 (Psyllidae) 害蟲危害 (Scutareanu *et al*. 1997)、啤酒花遭受指頭蚜 (*Phorodon humuli* Schrank) 危害 (Campbell *et al*. 1993)、稠李 (bird cherry) 遭受禾谷麥蚜危害 (Glinwood & Pettersson 2000; Ninkovic *et al*. 2003)、馬鈴薯遭受科羅拉多金花蟲 (*Leptinotarsa decemlineata* Say) 危害 (Bolter *et al*. 1997)、菸草 (*Nicotiana attenuate*) 遭受鱗翅目害蟲及葉蚤危害 (Kessler & Baldwin 2001) 及 *Lotus japonicas* 遭受二點葉蟎危害 (Ozawa *et al*. 2000)。因此水楊酸甲酯被稱為蟲害誘導揮發性成分。

前人研究中水楊酸甲酯可吸引多種天敵，James (2003a, 2003b, 2005, 2006) 以黃色黏板搭配水楊酸甲酯於啤酒花田及葡萄田證實顯著誘捕食蚜蠅 (hover flies)、大眼長蝽 (*Geocoris pallens* Stal)、食蟎瓢蟲 (*Stethorus punctum picipes* Casey)、綠草蛉 (*Chrysopa nigricornis* Burmeister 及 *Chrysopa oculata* Say)、小黑花椿象 (*Orius tris ticolor* White)。Lee (2010) 以白色黏板搭配水楊酸甲酯於草莓田顯著誘捕草蛉 (Chrysopidae) 及小黑花椿象。James & Price (2004) 於葡萄田以黃色黏板搭配水楊酸甲酯顯著誘捕綠草蛉 (*C. nigricornis*)、褐草蛉 (*Hemerobius* sp.)、盲蝽 (*Der-*

投稿日期：2018 年 1 月 17 日；接受日期：2018 年 2 月 13 日。
[*] 通訊作者：bchen@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所應用動物組助理研究員。台灣 台中市。

*aeocoris brevis* Uhler)、食蟎瓢蟲及小黑花椿象等 5 種捕食性天敵。James & Grassswitz (2005) 於葡萄田以黃色黏板搭配水楊酸甲酯顯著誘捕跳小蜂科 (Encyrtidae) 寄生蜂 *Metaphycus* sp. 及纓小蜂科 (Mymaridae) 寄生蜂 *Anagrus* spp.。Rodriguez-Saona *et al*. (2011) 於蔓越莓田以黃色黏板搭配水楊酸甲酯證實可顯著誘捕食蚜蠅科 (Syrphidae)、瓢蟲科 (Coccinellidae) 及草蛉科 (Chrysopidae) 等捕食性天敵。Zhu & Park (2005) 於大豆田以黃色黏板搭配水楊酸甲酯顯著誘引七星瓢蟲 (*Coccinella septempunctata* L.)。除此之外，Shimoda *et al*. (2002) 發現萊豆 (lima bean) 葉片經水楊酸甲酯處理顯著誘引高橋食蟎薊馬 (*Scolothrips takahashii* Priesner)。De Boer & Dicke (2004) 於 Y 型管試驗中證實智利捕植蟎 (*Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot) 顯著受水楊酸甲酯誘引。

除吸引害蟲天敵外，在有機大豆田 Mallinger *et al*. (2011) 證實施用水楊酸甲酯吸引食蚜蠅及草蛉並降低大豆蚜族群。Gadino *et al*. (2012) 在葡萄園懸掛低密度 (260 lures ha$^{-1}$) 水楊酸甲酯顯著降低田間薊馬族群。Woods *et al*. (2011) 在啤酒花田施用水楊酸甲酯顯著誘引食蟎瓢蟲並較對照區降低 40–91% 二點葉蟎數量。上述結果顯示，應用水楊酸甲酯增強害蟲/蟎生物防治的潛力。

農產品的農藥殘留問題，一直是消費者在意的食安問題，因此傳統施用農藥防治害蟲的替代方式成為研究方向。生物防治本自然發生，利用天敵防治害蟲是一種安全、有效及永續的防治方法 (Peñaflor & Bento 2013)。但生物防治常面臨害蟲族群數量高而天敵數量少，達不到壓制害蟲族群效果。如何於害蟲初來臨時，便能吸引天敵前來，是田間生物防治成功的關鍵 (Stenberg *et al*. 2015)。水楊酸甲酯作為一種廣效可誘引多種害蟲天敵的蟲害誘導揮發性成分，並且有應用於田間壓制害蟲族群的實例，具有應用於田間的潛力。惟國內目前並無詳盡的水楊酸甲酯吸引天敵研究。因此，本研究於農業試驗所果樹區以黃色黏板搭配不同濃度水楊酸甲酯，於 2015–2016 年調查所能誘捕到的捕食性天敵的種類，並探討不同季節間的差異。藉由此項研究我們期望能明瞭水楊酸甲酯於田間吸引捕食性天敵的效果及未來發展利用水楊酸甲酯增強害蟲生物防治的潛力。

## 材料與方法

本試驗所使用的水楊酸甲酯 (99%) 及無水酒精 (ethanol)， 均購買自台灣默克股份有限公司 (台灣台北市)。透明玻璃瓶 (1.9 cm × 6 cm) 購自 Kimble 公司 (Vineland, NJ, USA)，黃色黏板 (37 cm × 19 cm) 及單螺線 (直徑 0.1 cm) 均購買自振詠興業公司 (台灣台中市)。

本試驗用所使用的水楊酸甲酯釋放器具為參考 James (2003b) 的方法，將透明玻璃瓶內分別裝入 99、10、1、0.1、0.01% 水楊酸甲酯 (以無水酒精調製)、無水酒精 (以下稱 Ethanol 處理組) 及維持空白不添加任何東西 (以下稱 Blank 處理組)。玻璃瓶上方瓶蓋正中央有一直徑 0.3 cm 圓孔讓水楊酸甲酯氣味自然散出。整個玻璃瓶以黑色膠帶包覆，以避免陽光照射造成的影響。

水楊酸甲酯搭配黃色黏板的方法參照 Dong & Hwang (2016)，將水楊酸甲酯釋放器以單螺線綁定後，單螺線穿過黃色黏板上方中間的開孔，並將水楊酸甲酯釋放器附於黃色黏板上後，整個含釋放器的黃色黏板懸掛於田間用於捕食性天敵的調查。

捕食性天敵的調查為將含釋放器 (內含 99、10、1、0.1、0.01%水楊酸甲酯、Ethanol 或 Blank) 的黃色黏板懸掛於農業試驗所試驗果樹區 (24°01'44.6"N, 120°41'41.7"E)，果樹區面積約為 10 ha，主要種植果樹分別為芒果、桃、梨、李等，果樹區採人工除草但視病蟲害程度不定期噴施藥劑 (殺菌劑，試驗期間未有大發生蟲害故無噴施殺蟲劑情事)。含釋放器黃色黏板直接懸掛於作物枝條上或是懸掛於支撐架上 (Dong & Hwang 2016)，各黃色黏板間隔至少 25 m。於 2015–2016 年間進行調查，每隔 2 wk 更換 1 次黃色黏板及釋放器，並於試驗室內檢視記錄黃色黏板捕獲的捕食性天敵種類 (鑑定至科) 及數量，每處理 20 重複。調查資料除全年統計外，另依春夏秋冬四季 (Shin 2011) 分別統計調查資料。

試驗所得各項資料先以 SAS-EG (Version

7.1, 2014) 統計分析軟體，進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 後，再以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD test) 分析其差異顯著性。水楊酸甲酯處理組所得資料經分析後，同時與 Ethanol 及 Blank 有顯著差異，方視為與對照組有顯著差異。

# 結果

所有水楊酸甲酯處理組於 2015–2016 年調查中，顯著較對照組誘捕更多的捕食性天敵，其中以 0.1% 水楊酸甲酯處理組數量最高。於個別季節中，水楊酸甲酯處理組於夏季及冬季顯著較對照組誘捕更多的捕食性天敵，於秋季僅 0.1% 水楊酸甲酯處理組較對照組顯著誘捕更多的捕食性天敵。在濃度方面，0.1% 水楊酸甲酯於全年及個別季節中，均較對照組誘捕更多的捕食性天敵效果最好 (表 1)。本試驗中以水楊酸甲酯搭配黃色黏板進行捕食性天敵的調查，發現此資材對花蝽科捕食性天敵的誘捕效果最佳 (所有水楊酸處理組，2015–2016 全年度對花蝽科捕食性天敵誘引效果顯著高於對照組，表 2)，

**表 1.** 2015–2016 年不同濃度之水楊酸甲酯於果園中誘引捕食性天敵之效果。

**Table 1.** The effectiveness [means (± SE)] of methyl salicylate (MeSA) at different concentrations on attracting predators in fruit orchards in 2015–2016[z].

| | Mean number of predators (± SE) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2015–2016 | | | | |
| Treatment | Full year | Spring | Summer | Autumn | Winter |
| 99% MeSA | 826.2 (24.5) b | 278.8 (18.8) a | 267.8 (9.3) bc | 136.6 (9.1) b | 143.0 (9.8) bc |
| 10% MeSA | 840.6 (24.0) b | 267.8 (20.9) a | 274.2 (5.7) b | 142.4 (11.6) b | 156.2 (9.0) b |
| 1% MeSA | 791.4 (27.2) b | 238.8 (26.4) a | 241.8 (11.4) cd | 154.2 (6.3) b | 156.6 (7.8) b |
| 0.1% MeSA | 950.4 (13.3) a | 254.0 (23.5) a | 317.4 (12.9) a | 193.6 (11.2) a | 185.4 (11.1) a |
| 0.01% MesA | 810.2 (22.1) b | 249.4 (25.7) a | 266.2 (11.9) bc | 143.0 (14.8) b | 151.6 (5.3) b |
| Ethanol | 644.8 (18.8) d | 169.4 (16.2) b | 212.8 (5.5) de | 140.6 (10.4) b | 122.0 (11.2) c |
| Blank | 715.6 (34.1) c | 222.6 (16.8) ab | 211.6 (13.9) e | 161.4 (11.8) b | 120.0 (3.3) c |

[z] Experiments conducted in an orchard at Taiwan Agricultural Research Institute. For each natural enemy, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected LSD test). Spring: February–April; Summer: May–July; Autumn: August–October; and Winter: November–January.

**表 2.** 2015–2016 年不同濃度之水楊酸甲酯於果園中誘引花蝽科天敵之效果。

**Table 2.** The effectiveness [means (± SE)] of methyl salicylate (MeSA) at different concentrations on attracting Anthocoridae in fruit orchards in 2015–2016[z].

| | Mean number of Anthocoridae (± SE) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2015–2016 | | | | |
| Treatment | Full year | Spring | Summer | Autumn | Winter |
| 99% MeSA | 98.6 (4.7) b | 12.4 (1.9) ab | 63.4 (1.9) b | 14.4 (1.3) bc | 8.4 (1.1) bc |
| 10% MeSA | 103.4 (6.1) b | 9.8 (1.5) bc | 68.2 (2.0) b | 17.8 (2.5) ab | 7.6 (0.3) bc |
| 1% MeSA | 85.4 (7.4) c | 3.6 (1.0) d | 61.0 (5.6) b | 14.6 (1.9) bc | 6.2 (0.7) c |
| 0.1% MeSA | 145.6 (2.5) a | 13.8 (1.8) a | 91.0 (3.2) a | 23.8 (1.2) a | 17.0 (1.2) a |
| 0.01% MesA | 101.8 (6.2) b | 5.0 (0.3) c | 70.6 (4.7) b | 16.6 (3.0) bc | 9.6 (1.5) b |
| Ethanol | 63.6 (3.3) d | 2.8 (0.7) d | 35.8 (3.4) c | 18.8 (3.8) ab | 6.2 (1.2) c |
| Blank | 67.2 (2.7) d | 3.2 (0.7) d | 47.2 (4.6) c | 10.4 (2.2) c | 6.4 (0.9) bc |

[z] Experiments conducted in an orchard at Taiwan Agricultural Research Institute. For each column, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected LSD test). Spring: February–April; Summer: May–July; Autumn: August–October; and Winter: November–January.

其次依序為盲蝽科 (表 3)、瓢蟲科 (表 4)、草蛉科 (表 5)、食蚜蠅科 (表 6) 及隱翅蟲科 (表 7)。

10% 水楊酸甲酯處理組及 0.1% 水楊酸甲酯處理組於 2015–2016 年調查中，較對照組顯著誘捕更多的瓢蟲科捕食性天敵。於個別季節中，除 99% 水楊酸甲酯處理組外，其餘水楊酸甲酯處理組於冬季較對照組顯著誘捕更多的瓢蟲科捕食性天敵，其中以 0.1% 水楊酸甲酯效果最好。但在春、夏及秋季中，水楊酸甲酯對瓢蟲科捕食性天敵誘引效果不顯著 (表 4)。

10% 水楊酸甲酯處理組、1% 水楊酸甲酯處理組及 0.1% 水楊酸甲酯處理組於 2015–2016 年調查中，較對照組顯著誘捕更多的草蛉科捕食性天敵。於個別季節中，所有水楊酸甲酯處理組於夏季較對照組顯著誘捕更多的草蛉科捕食性天敵，其中以 0.1% 水楊酸甲酯效果最好。但在春、秋及冬季中，水楊酸甲酯對草蛉科捕食性天敵誘引效果不顯著 (表 5)。

所有水楊酸甲酯處理組於 2015–2016 年調查中，較對照組並未顯著誘捕更多的食蚜蠅。於個別季節中，99% 水楊酸甲酯處理組、0.1% 水楊酸甲酯處理組及 0.01% 水楊酸甲酯處理組於

**表 3.** 2015–2016 年不同濃度之水楊酸甲酯於果園中誘引盲蝽科天敵之效果。

**Table 3.** The effectiveness [means (± SE)] of methyl salicylate (MeSA) at different concentrations on attracting Miridae in fruit orchards in 2015–2016[z].

| | Mean number of Miridae (± SE) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2015–2016 | | | | |
| Treatment | Full year | Spring | Summer | Autumn | Winter |
| 99% MeSA | 35.2 (2.4) b | 3.8 (0.6) ab | 23.8 (1.9) b | 6.4 (1.1) bc | 1.2 (0.3) cd |
| 10% MeSA | 33.0 (1.1) b | 3.2 (0.7) bc | 20.4 (1.2) b | 7.2 (1.0) b | 2.2 (0.4) bc |
| 1% MeSA | 22.8 (1.4) c | 0.6 (0.3) d | 14.8 (1.2) c | 5.4 (0.7) bc | 2.0 (0.6) c |
| 0.1% MeSA | 61.6 (3.1) a | 4.4 (0.4) a | 37.6 (3.4) a | 13.8 (0.8) a | 5.8 (0.4) a |
| 0.01% MesA | 31.6 (2.5) b | 2.2 (0.4) c | 21.4 (2.0) b | 7.0 (1.3) b | 1.0 (0.5) cd |
| Ethanol | 11.2 (1.1) d | 0.0 (0.0) d | 8.8 (0.6) d | 2.4 (0.5) d | 0.0 (0.0) d |
| Blank | 19.8 (3.2) c | 0.0 (0.0) d | 12.2 (2.2) d | 4.2 (1.0) cd | 3.4 (0.7) b |

[z] Experiments conducted in an orchard at Taiwan Agricultural Research Institute. For each column, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected LSD test). Spring: February–April; Summer: May–July; Autumn: August–October; and Winter: November–January.

**表 4.** 2015–2016 年不同濃度之水楊酸甲酯於果園中誘引瓢蟲科天敵之效果。

**Table 4.** The effectiveness [means (± SE)] of methyl salicylate (MeSA) at different concentrations on attracting Coccinellidae in fruit orchards in 2015–2016[z].

| | Mean number of Coccinellidae (± SE) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2015–2016 | | | | |
| Treatment | Full year | Spring | Summer | Autumn | Winter |
| 99% MeSA | 609.8 (21.8) abc | 238.6 (18.9) a | 152.8 (6.8) ab | 101.8 (8.9) bc | 116.6 (8.4) bc |
| 10% MeSA | 621.6 (15.4) ab | 237.0 (19.5) a | 160.0 (5.1) a | 96.2 (9.9) c | 128.4 (6.9) ab |
| 1% MeSA | 588.0 (30.2) bc | 210.0 (27.8) ab | 138.8 (9.8) bc | 108.0 (7.8) abc | 131.2 (7.1) ab |
| 0.1% MeSA | 657.6 (10.6) a | 221.6 (23.0) a | 158.0 (10.9) ab | 131.4 (13.7) a | 146.6 (10.3) a |
| 0.01% MesA | 597.6 (22.3) abc | 224.6 (25.0) a | 149.4 (7.1) ab | 97.8 (12.8) bc | 125.8 (5.3) ab |
| Ethanol | 487.6 (23.2) d | 151.2 (16.4) b | 142.4 (7.0) abc | 95.0 (8.3) c | 99.0 (11.4) c |
| Blank | 554.6 (28.8) c | 200.0 (16.9) a | 127.4 (9.2) c | 126.6 (11.5) ab | 100.6 (3.0) c |

[z] Experiments conducted in an orchard at Taiwan Agricultural Research Institute. For each natural enemy, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected LSD test). Spring: February–April; Summer: May–July; Autumn: August–October; and Winter: November–January.

表 5. 2015–2016 年不同濃度之水楊酸甲酯於果園中誘引草蛉科天敵之效果。

**Table 5.** The effectiveness [means (± SE)] of methyl salicylate (MeSA) at different concentrations on attracting Chrysopidae in fruit orchards in 2015–2016[z].

| | Mean number of Chrysopidae (± SE) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2015–2016 | | | | |
| Treatment | Full year | Spring | Summer | Autumn | Winter |
| 99% MeSA | 4.0 (0.8) ab | 1.6 (0.7) a | 1.8 (0.3) a | 0.6 (0.3) bc | 0.0 (0.0) b |
| 10% MeSA | 5.2 (1.1) a | 0.6 (0.3) ab | 2.2 (0.7) a | 1.8 (0.6) a | 0.6 (0.3) ab |
| 1% MeSA | 4.8 (0.7) a | 1.2 (0.3) a | 1.8 (0.3) a | 0.6 (0.3) bc | 1.2 (0.3) a |
| 0.1% MeSA | 4.2 (0.6) a | 0.6 (0.3) ab | 3.0 (0.6) a | 0.0 (0.0) c | 0.6 (0.3) ab |
| 0.01% MesA | 3.6 (0.5) ab | 1.2 (0.3) a | 1.8 (0.6) a | 0.0 (0.0) c | 0.6 (0.3) ab |
| Ethanol | 2.4 (0.5) b | 0.6 (0.3) ab | 0.0 (0.0) b | 1.2 (0.6) ab | 0.6 (0.3) ab |
| Blank | 0.0 (0.0) c | 0.0 (0.0) b | 0.0 (0.0) b | 0.0 (0.0) c | 0.0 (0.0) b |

[z] Experiments conducted in an orchard at Taiwan Agricultural Research Institute. For each column, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected LSD test). Spring: February–April; Summer: May–July; Autumn: August–October; and Winter: November–January.

表 6. 2015–2016 年不同濃度之水楊酸甲酯於果園中誘引食蚜蠅科天敵之效果。

**Table 6.** The effectiveness [means (± SE)] of different concentrations of methyl salicylate (MeSA) on attracting Syrphidae in fruit orchards in 2015–2016[z].

| | Mean number of Syrphidae (± SE) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2015–2016 | | | | |
| Treatment | Full year | Spring | Summer | Autumn | Winter |
| 99% MeSA | 9.8 (0.8) a | 2.2 (0.4) ab | 4.8 (0.3) a | 0.0 (0.0) c | 2.8 (0.4) b |
| 10% MeSA | 11.8 (1.6) a | 2.8 (0.4) ab | 2.8 (0.8) bc | 1.8 (0.6) a | 4.4 (0.8) a |
| 1% MeSA | 6.6 (1.5) b | 3.6 (1.3) a | 1.2 (0.6) d | 0.0 (0.0) c | 1.8 (0.3) bc |
| 0.1% MeSA | 7.4 (0.4) ab | 1.2 (0.3) b | 3.0 (0.3) ab | 0.6 (0.3) bc | 2.6 (0.6) b |
| 0.01% MesA | 11.0 (1.2) a | 3.6 (0.9) a | 4.0 (0.6) a | 1.2 (0.6) ab | 2.2 (0.4) b |
| Ethanol | 7.6 (0.9) ab | 1.6 (0.7) b | 1.8 (0.6) cd | 0.0 (0.0) c | 4.2 (0.2) a |
| Blank | 5.2 (0.4) b | 2.8 (0.7) ab | 0.6 (0.3) d | 1.2 (0.6) ab | 0.6 (0.3) c |

[z] Experiment conducted in an orchard at Taiwan Agricultural Research Institute. For each column, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected LSD test). Spring: February–April; Summer: May–July; Autumn: August–October; and Winter: November–January.

夏季較對照組顯著誘捕更多的食蚜蠅，以 99% 水楊酸甲酯效果最好。但在春、秋及冬季中，水楊酸甲酯對食蚜科捕食性天敵誘引效果不顯著 (表 6)。

所有水楊酸甲酯處理組於 2015–2016 年調查中，顯著較對照組誘捕更多的花蝽科捕食性天敵，其中以 0.1% 水楊酸甲酯處理組數量最高。於個別季節中，所有水楊酸甲酯處理組於春季及夏季，顯著較對照組誘捕更多的花蝽科捕食性天敵，其中亦以 0.1% 水楊酸甲酯效果最好。於冬季，僅 0.1% 水楊酸甲酯處理組顯著較對照組誘捕更多的花蝽科捕食性天敵，但水楊酸甲酯於秋季對花蝽科捕食性天敵誘引效果不顯著 (表 2)。

除 1% 水楊酸甲酯處理組外，其餘水楊酸甲酯處理組於 2015–2016 年調查中，顯著較對照組誘捕更多的盲蝽科捕食性天敵，其中以 0.1% 水楊酸甲酯效果最好。於個別季節中，水楊酸甲酯處理組於春、夏及秋季，顯著較對照組誘捕更多的盲蝽科捕食性天敵，其中以 0.1% 水楊酸甲酯效果最好。於冬季，僅 0.1% 水楊酸甲酯較對照組誘捕更多的盲蝽科捕食性天敵 (表 3)。

表 7. 2015–2016 年不同濃度之水楊酸甲酯於果園中誘引隱翅蟲科天敵之效果。

**Table7.** The effectiveness [means (± SE)] of different concentrations of methyl salicylate (MeSA) on attracting Staphylinidae in fruit orchards in 2015–2016[z].

| | Mean number of Staphylinidae (± SE) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2015–2016 | | | | |
| Treatment | Full year | Spring | Summer | Autumn | Winter |
| 99% MeSA | 68.8 (1.8) b | 20.2 (0.4) a | 21.2 (1.1) a | 13.4 (0.4) d | 14.0 (1.2) a |
| 10% MeSA | 65.6 (3.8) b | 14.4 (1.1) cd | 20.6 (0.9) a | 17.6 (2.3) cd | 13.0 (1.1) a |
| 1% MeSA | 83.8 (5.1) a | 19.8 (1.9) ab | 24.2 (2.7) a | 25.6 (2.0) a | 14.2 (0.7) a |
| 0.1% MeSA | 74.0 (6.3) ab | 12.4 (0.9) d | 24.8 (1.7) a | 24.0 (4.3) abc | 12.8 (1.8) a |
| 0.01% MesA | 64.6 (2.7) b | 12.8 (1.3) d | 19.0 (1.8) a | 20.4 (1.9) abc | 12.4 (0.7) a |
| Ethanol | 72.4 (4.8) ab | 13.2 (1.0) d | 24.0 (3.4) a | 23.2 (1.9) ab | 12.0 (1.2) ab |
| Blank | 68.8 (2.7) b | 16.6 (1.3) bc | 24.2 (1.8) a | 19.0 (1.8) bcd | 9.0 (1.2) b |

[z] Experiments conducted in an orchard at Taiwan Agricultural Research Institute. For each column, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected LSD test). Spring: February–April; Summer: May–July; Autumn: August–October; and Winter: November–January.

所有水楊酸甲酯處理組於 2015–2016 年調查中，所誘捕隱翅蟲科捕食性天敵數量與對照組間無顯著差異。於個別季節中，僅 99% 水楊酸甲酯處理組於春季顯著較對照組誘捕更多的隱翅蟲科捕食性天敵，水楊酸甲酯於夏、秋及冬季，對隱翅蟲科捕食性天敵誘引效果不顯著 (表 7)。

## 討論

水楊酸甲酯於前人研究中證實，多種捕食性天敵包括瓢蟲、草蛉、花椿象、盲蝽、大眼長蝽、食蚜蠅及捕植蟎等，會受水楊酸甲酯誘引 (Drukker *et al*. 2000; James 2003b; James & Price 2004; James 2005; Zhu & Park 2005; James 2006; Woods *et al*. 2011; Gadino *et al*. 2012)。本試驗 2015–2016 年調查結果，亦證實所有水楊酸甲酯處理組於全年度顯著較對照組捕獲更多的捕食性天敵。依全年度及個別季節調查資料來看，水楊酸甲酯對花蝽科捕食性天敵的誘捕效果最好，其次依序為盲蝽科、瓢蟲科、草蛉科、食蚜蠅科及隱翅蟲科。而濃度方面，則以 0.1% 水楊酸甲酯最佳 (除對草蛉、食蚜蠅及隱翅蟲)，顯示水楊酸甲酯亦有應用於台灣的農業環境誘引捕食性天敵的潛力。

本試驗結果不同濃度水楊酸甲酯處理對不同捕食性天敵誘引效果存在差異性外，水楊酸甲酯對捕食性天敵的誘引效果，於濃度間並未成比例增加或減少。Zhu & Park (2005) 研究水楊酸甲酯對七星瓢蟲的誘引效果，結果七星瓢蟲受 10、100 及 300 mg 水楊酸甲酯誘引的效果，顯著高於 30 mg 及 1 g 處理組，亦顯示出並非伴隨水楊酸甲酯施用濃度提高增加對七星瓢蟲的誘引效果。顯示水楊酸甲酯對捕食性天敵誘引效果，取決於使用濃度，因此田間使用水楊酸甲酯時選擇對標的天敵合適的使用濃度，是必須要考慮的因素。於本試驗中，0.1% 水楊酸甲酯於全年中對捕食性天敵誘引效果最好。而個別季節中的夏、秋及冬季，均誘引最多的捕食性天敵，於春季中雖然 0.1% 水楊酸甲酯誘引效果不是最好，但仍顯著高於對照組。在個別捕食性天敵方面，除隱翅蟲科捕食性天敵外，其餘捕食性天敵均可受 0.1% 水楊酸甲酯誘引，其中瓢蟲冬季及全年度、草蛉夏季及全年度、食蚜蠅夏季、花蝽春、夏、冬及全年度、盲蝽四季及全年度。

除了水楊酸甲酯濃度不同會影響對捕食性天敵誘引的效果外，不同捕食性天敵於不同季節間對不同濃度水楊酸甲酯的反應亦存在差異。以瓢蟲科捕食性天敵為例，0.1% 水楊酸甲酯於冬季較對照組顯著誘捕更多的瓢蟲，但在春季、夏季及秋季所誘捕的瓢蟲數量雖然比對照組多但並無顯著差異。類似的情形亦存在草蛉、食

蚜蠅、花蝽及盲蝽的調查結果，其中盲椿於全年四季中均受 0.1% 水楊酸甲酯誘引，而花蝽除秋季 (雖然無顯著差異但 0.1% 水楊酸甲酯所誘捕花蝽數量仍較對照組多) 外，亦均顯著受 0.1% 水楊酸甲酯誘引，顯示 0.1% 水楊酸甲酯具有應用於田間吸引花蝽及盲椿科捕食性天敵潛力。

前人研究中作物、季節及天敵生理狀態等內外不同因子，皆有可能影響水楊酸甲酯對天敵的誘引效果 (James 2005)。小黑花椿象 (*O. tristicolor*) 於夏季試驗中，明顯受水楊酸甲酯誘引，但在秋季試驗中，則對水楊酸甲酯無反應。此外，於田間試驗中水楊酸甲酯於九月上旬可誘捕食蟎瓢蟲 (S. *punctum picipes*)，但於九月下旬及十月水楊酸甲酯對食蟎瓢蟲無誘引效果。可能的原因，作者推測為此時期食蟎瓢蟲進入冬眠期 (James 2003b; James & Price 2004; James 2005)。本試驗中捕食性天敵對水楊酸甲酯反應季節差異性的原因，目前尚未明瞭仍需要進一步研究。

Lee (2010) 以水楊酸甲酯搭配白色黏板於草莓田進行天敵調查，試驗結果水楊酸甲酯對隱翅蟲科捕食性天敵無明顯的誘引效果。雖然本試驗 2015–2016 年全年度調查結果，水楊酸甲酯對隱翅蟲科捕食性天敵亦無顯著誘引效果，但於春季時，99% 水楊酸甲酯處理組較對照組顯著誘捕更多的隱翅蟲科捕食性天敵。本試驗調查作物非草莓，且前人研究調查期間分別為 5–7 月及 6–8 月，非本試驗有顯著差異的春季 (2–4 月)，可能因與前人試驗作物與季節之不同而產生差異。

綜合上述結果，水楊酸甲酯於本試驗條件下，證實對多種捕食性天敵具有誘引效果，其中以花椿科及盲椿科捕食性天敵效果最好。但水楊酸甲酯對捕食性天敵的誘引效果，取決於施用濃度 (0.1% 水楊酸甲酯效果較佳)，而且捕食性天敵於不同季節對水楊酸甲酯的反應亦存在差異性。未來研究針對不同作物環境下標的天敵的發生動態，與對不同濃度水楊酸甲酯的反應，可明瞭水楊酸甲酯的最適施用時機與濃度，進一步達到利用水楊酸甲酯增進作物害蟲生物防治效果。

# 引用文獻


Agrawal, A. A., A. Janssen, J. Brun, M. A. Posthumus, and M. W. Sabelis. 2002. An ecological cost of plant defence: Attractiveness of bitter cucumber plants to natural enemies of herbivores. Ecol. Lett. 5:377–385.

Bolter, C. J., M. Dicke, J. J. A. Van Loon, J. H. Visser, and M. A. Posthumus. 1997. Attraction of Colorado potato beetles to herbivore-damaged plants during herbivory and after its termination. J. Chem. Ecol. 23:1003–1023.

Campbell, C. A. M., J. Pettersson, J. A. Pickett, L. J. Wadhams, and C. M. Woodcock. 1993. Spring migration of Damson-Hop aphid, *Phorodon humuli* (Homoptera: Aphididae), and summer host plant-derived semiochemicals released on feeding. J. Chem. Ecol. 19:1569–1576.

De Boer, J. G. and M. Dicke. 2004. The role of methyl salicylate in prey searching behavior of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*. J. Chem. Ecol. 30:255–271.

Dicke, M., M. W. Sabelis, J. Takabayashi, J. Bruin, and M. A. Posthumus. 1990. Plant strategies of manipulating predatory-prey interactions through alleochemicals: Prospects for application in pest control. J. Chem. Ecol. 16:3091–3118.

Dicke, M., J. Takabayashi, M. A. Posthumus, C. Schütte, and O. E. Krips. 1998. Plant-phytoeiid interactions mediated by prey-induced plant volatiles: Variation in production of cues and variation in responses of predatory mites. Exp. Appl. Acarol. 22:311–333.

Dong, Y. J. and S. Y. Hwang. 2016. Evaluation of the effectiveness of four herbivore-induced plant volatiles on attracting natural enemies. J. Taiwan Agric. Res. 62:173–183.

Drukker, B., J. Bruin, and M. W. Sabelis. 2000. Anthocorid predators learn to associated herbivore induced plant volatiles with presence or absence of prey. Physiol. Entomol. 25:260–265.

Gadino, A. N., V. M. Walton, and J. C. Lee. 2012. Evaluation of methyl salicylate lures on populations of *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae) and other natural enemies in western Oregon vineyards. Biol. Control 63:48–55.

Geervliet, J. B. F., M. A. Posthumus, L. E. M. Vet, and M. Dicke. 1997. Comparative analysis of headspace volatiles from different caterpillar-infested food plants of *Pieris* species. J. Chem. Ecol. 23:2935–2954.

Glinwood, R. and J. Pettersson. 2000. Host choice and host leaving in *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera:

Aphididae) emigrants and repellency of aphid colonies on the winter host. Bull. Entomol. Res. 90:57–61.

James, D. G. 2003a. Field evaluation of herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects: Methyl salicylate and the green lacewing, *Chrysopa nigricornis*. J. Chem. Ecol. 29:1601–1609.

James, D. G. 2003b. Synthetic herbivore-induced plant volatiles as field attractants for beneficial insects. Environ. Entomol. 32:977–982.

James, D. G. 2005. Further field evaluation of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. J. Chem. Ecol. 31:481–495.

James, D. G. 2006. Methyl salicylate is a field attractant for the goldeneyed lacewing, *Chrysopa oculata*. Biocontrol Sci. Technol. 16:107–110.

James, D. G. and T. R. Grasswitz. 2005. Synthetic herbivore-induced plant volatiles increase field captures of parasitic wasps. BioControl 50:871–880.

James, D. G. and T. S. Price. 2004. Field-testing of methyl-salicylate for recruitment and retention of beneficial insects in grapes and hops. J. Chem. Ecol. 30:1613–1628.

Kessler, A. and I. T. Baldwin. 2001. Function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. Science 291:2141–2144.

Kessler, A. and I. T. Baldwin. 2002. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. Annu. Rev. Plant Biol. 53:299–328.

Lee, J. C. 2010. Effect of methyl salicylate-based lures on beneficial and pest arthropods in strawberry. Environ. Entomol. 39:653–660.

Mallinger, R. E., D. B. Hogg, and C. Gratton. 2011. Methyl salicylate attracts natural enemies and reduces populations of soybean aphids (Hemiptera: Aphididae) in soybean agroecosystems. J. Econ. Entomol. 104:115–124.

Ninkovic, V., E. Ahmed, R. Glinwood, and J. Pettersson. 2003. Effects of two types of semiochemicals on population development of the bird cherry oat aphid *Rhopalosiphum padi* in a barley crop. Agric. For. Entomol. 5:27–33.

Ozawa, R., T. Shimoda, M. Kawaguchi, G. Arimura, J. Horiuchi, T. Nishioka, and J. Takabayashi. 2000. *Lotus japonicus* infested with herbivorous mites emits volatile compounds that attract predatory mites. J. Plant Res. 113:421–433.

Park, S. W., E. Kaimoyo, D. Kumar, S. Mosher, and D. F. Klessig. 2007. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. Science 318:113–116.

Peñaflor, M. F. and J. M. Bento. 2013. Herbivore-induced plant volatiles to enhance biological control in agriculture. Neotrop. Entomol. 42:331–343.

Rodriguez-Saona, C., I. Kaplan, J. Braasch, D. Chinnasamy, and L. Williams. 2011. Field responses of predaceous arthropods to methyl salicylate: A meta-analysis and case study in cranberries. Biol. Control 59:294–303.

Scutareanu, P., B. Drukker, J. Bruin, M. A. Posthumus, and M. W. Sabelis. 1997. Volatiles from *Psylla*-infested pear trees and their possible involvement in attraction of anthocorid predators. J. Chem. Ecol. 23:2241–2260.

Shimoda, T., R. Ozawa, G. I. Arimura, J. Takabayashi, and T. Nishioka. 2002. Olfactory responses of two specialist insect predators of spider mites toward plant volatiles from lima bean leaves induced by jasmonic acid and/or methyl salicylate. Appl. Entomol. Zool. 37:535–541.

Shin, T. C. 2011. Taiwan 24 Solar Terms and Climate: 1981–2010 Statistics. Central Weather Bureau. Taipei, Taiwan. 206 pp. (in Chinese)

Shulaev, V., P. Silverman, and I. Raskin. 1997. Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. Nature 385:718–721.

Stenberg, J. A., M. Heil, I. Åhman, and C. Björkman. 2015. Optimizing crops for biocontrol of pests and disease. Trends Plant Sci. 20:698–712.

Vlot, A. C., D. F. Klessig, and S. W. Park. 2008. Systemic acquired resistance: The elusive signal(s). Curr. Opin. Plant Biol. 11:436–442.

Woods, J. L., D. G. James, J. C. Lee, and D. H. Gent. 2011. Evaluation of airborne methyl salicylate for improved conservation biological control of two-spotted spider mite and hop aphid in Oregon hop yards. Exp. Appl. Acarol. 55:401–416.

Zhu, J. and K. C. Park. 2005. Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. J. Chem. Ecol. 31:1733–1746.

# Evaluating the Effectiveness of Methyl Salicylate on Attracting Predators

Yaw-Jen Dong[1] and Bei-Chen Hsiu[1,*]

## Abstract

Dong, Y. J. and B. C. Hsiu. 2018. Evaluating the effectiveness of methyl salicylate on attracting predators. J. Taiwan Agric. Res. 67(3):283–291.

The yellow sticky paper baited with different concentrations of methyl salicylate (MeSA) was field-tested for the effectiveness of attracting natural enemies in fruit orchards of the Taiwan Agricultural Research Institute during 2015–2016. The results showed that yellow sticky paper baited with MeSA significantly attracted more predators in Coccinellidae (99, 10, and 0.1% MeSA treatments, 2015–2016 full year), Chrysopidae (10, 1, and 0.1% MeSA treatments, 2015–2016 full year), Syrphidae (99, 0.1, and 0.01% MeSA treatments, 2015–2016 summer season), Anthocoridae (all MeSA treatments, 2015–2016 full year), Miridae (99, 10, 0.1, and 0.01% MeSA treatments, 2015–2016 full year), and Staphylinidae (99% MeSA treatment, 2015–2016 Spring season) than the control, but the attractions were varied with different concentrations and response of predators to different concentrations of MeSA was found variable in different seasons.

**Key words:** Methyl Salicylate, Predators, Biological Control.

Received: January 17, 2018; Accepted: February 13, 2018.

* Corresponding author, e-mail: bchen@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellows, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(3):292–300 (2018)
DOI:10.6156/JTAR.201809_67(3).0006

研究報告

# 油茶籽儲藏條件對壓榨油品質之影響

謝靜敏[1] 楊正釧[2] 盧虎生[3] 莊曜駿[4] 徐光平[5] 李雅琳[6,*]

## 摘要

謝靜敏、楊正釧、盧虎生、莊曜駿、徐光平、李雅琳。2018。油茶籽儲藏條件對壓榨油品質之影響。台灣農業研究 67(3):292–300。

本試驗將採收後立即乾燥至含水率 6.5% 及 12% 的台灣原生小果油茶 (短柱山茶，*Camellia brevistyla*) 種子，於 -20、4、15℃環境下密封儲藏半年後榨油，將初榨油保存在密封的玻璃瓶中，於 4℃儲放半年後開封，進行油脂的酸價、過氧化價、酚類化合物含量、還原力、維生素 E 含量、油脂氧化安定性等分析。結果顯示，只要是無霉爛現象品質良好的油茶籽，經過半年儲藏後壓榨的油脂品質，其酸價、過氧化價等均可與鮮榨油相當，仍具有良好的食用品質。另仿效家庭使用習慣，將油脂放置於 4℃冰箱，時常打開瓶蓋取用，再經過半年後檢測。結果顯示，含水率 6.5% 的油茶籽，在 4℃以下儲藏者的壓榨油品質較佳，而保存於 -20℃的油茶籽壓榨油，不僅其內含酚類化合物及還原力的衰減最少，且具有最佳的氧化安定性，此時仍可達到壓榨苦茶油國家一級品質標準 (酸價 < 1.5、過氧化價 < 6)。

**關鍵詞**：小果油茶籽、油茶籽儲藏條件、種子含水率、儲藏溫度、油脂品質。

## 前言

山茶科 (Theaceae) 的茶樹屬 (*Camellia*) 為常綠灌木或小喬木，起源於亞洲大陸東岸至長江流域，在台灣廣為栽植。用於榨油的品種 (species) 主要有兩個:「大果油茶」(*C. oleifera*) 與「小果油茶」(*C. brevistyla*，短柱山茶，先前分類學名為細葉山茶 *C. tenuifolia*)。油茶樹的種子，稱為油茶籽 (oil tea seeds)，其榨出油稱為油茶籽油 (oil tea seeds oil)，台灣常稱之為苦茶油；中國大陸稱為山茶油或是茶油，日本則稱為椿油。成熟的油茶籽含油量一般可高於 30% (乾重)。苦茶油可作為食物之外，亦可用於化妝品原料，榨油後的油粕也具有多種用途，在台灣被用為有機肥料、清潔劑、水產養殖池的消毒劑及殺螺劑等，其果殼可以用於萃取酚類化合物、單寧、糠醛等有用成分。台灣所稱茶油，則是專指用於採收茶葉的茶樹 (*C. sinensis*) 產生的茶籽壓榨油，屬於茶葉茗品產業的副產品，並且茶籽的含油率較低 (約 20%)，油脂脂肪酸組成與胡麻油、花生油相近 (Hsieh *et al*. 2013)。

苦茶油脂肪酸組成中含有高比例油酸 (oleic acid)，可達 80% 以上 (Zhong *et al*. 2007)。攝取油酸已被科學界認為可以降低心血管疾病的風險 (Kris-Etherton 1999; Sales-Campos *et al*. 2013)，因此苦茶油有東方橄欖油之美名。苦茶油為華人食用已有 2,000 年以上的歷史，在 16 世紀李時珍 (1518–1593 年) 所撰寫的本草綱目中，即已闡明苦茶油的生理功效，深深影響全球華人的飲食養生習慣至今。許多食療處方中含有苦茶油，被用於增進健康或是補身的營養

投稿日期：2015 年 12 月 19 日；接受日期：2018 年 3 月 23 日。
* 通訊作者：ylleet@tari.gov.tw
[1] 農委會林業試驗所育林組助理研究員。台灣 台北市。
[2] 農委會林業試驗所植物園組副研究員。台灣 台北市。
[3] 國立台灣大學農藝學系暨研究所教授。台灣 台北市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。
[5] 農委會林業試驗所木材纖維組聘用助理研究員。台灣 台北市
[6] 農委會農業試驗所生物技術組副研究員。台灣 台中市。

方劑，功效包括緩和胃食道逆流、胃潰瘍、氣喘、咳嗽、貧血、便祕等，並可調節血糖、改善血液循環及皮膚健康，也常被用於產後婦女的身體復原補品。

台灣原生的「小果油茶」，主要分布於台灣北部山區的闊葉林中，相較於大果種油茶樹，其油茶籽產量較低，又因一般民眾普遍認為小果苦茶油的功效優於大果苦茶油，所以售價高出許多。本研究針對「小果油茶」，研究其種子的儲藏條件對於壓榨油之品質影響。小果種油茶果直徑約 1−3 cm，其果皮較薄，內含 1−3 顆直徑 0.5−2 cm 的種子。這些種子的種仁殼薄且硬，約占種子重量 20% (乾重)。近年來，由於全球氣候變遷，發生許多嚴重的氣象災害，導致油茶籽產量大減，有關豐收年大量儲藏油茶籽，並於歉收年釋出以平衡市場供需之做法值得考量。因此，本研究探討油茶籽的儲藏條件對壓榨油品質的影響。油茶籽原料區分為 6.5%、12% 兩種含水率，儲放於不同溫度 (-20、4 及 15℃) 條件經半年後榨油，檢測分析其油脂的品質差異，以作為苦茶油產業發展之參考依據。

## 材料與方法

### 油茶籽與榨油處理

本試驗「小果油茶」果實採集自新竹縣峨眉鄉大地農場，鮮果採回後立即於室內以電風扇吹拂，加速其乾燥裂果，果實開裂後隨即汰除果皮並手工篩選良好油茶籽。油茶籽繼續於相對濕度 30%、25−30℃環境下乾燥，直至含水率達到 12% 或是 6.5% 時停止，以作為 2 種不同含水率之試驗材料。為避免處理及儲藏過程中油茶籽含水率發生變動，將每 1.2 kg 油茶籽分裝並以雙層鋁箔袋完全密封，分別於 -20、4 或 15℃環境儲藏 6 mo。以簡化標示 (表 1) 代表不同油茶籽及儲放條件：A、B 分別代表含水率 6.5%、12%，接續以 1、2、3 分別代表儲放於 -20、4 及 15℃環境。經過 6 mo 儲放後，於開封前均先經過室溫下回溫 12 h，再將這些油茶籽 (帶有種仁殼) 研磨成粉。分別取 1 kg、以原棉胚布包裹定型後，再以垂直式榨油機 (易動公司，台灣苗栗縣) 壓榨出油。產油量是以壓榨前帶布油茶籽餅減去榨油後的重量，榨油率則是此重量除以壓榨前帶布油茶籽餅的重量乘上 100%。

**表 1.** 榨油前油茶籽不同含水率與儲藏溫度樣品之表示代號。

**Table 1.** Representative symbols of the oilseeds with different moisture contents and storage temperatures before pressing.

| Moisture content of oil seeds | Storage temperature (stored for 6 mo) -20℃ | 4℃ | 15℃ |
|---|---|---|---|
| 6.5% | A1 | A2 | A3 |
| 12.0% | B1 | B2 | B3 |

榨出油立即倒入玻璃瓶，並以螺旋蓋鎖緊封口後置入 4℃冰箱儲放，半年之後開封。取出小量油脂用於分析，再旋緊螺旋蓋放回 4℃冰箱儲放。之後，則依一般家庭用油習慣，每隔一小段時間，即取用一次油脂，每次均旋緊螺旋蓋放回 4℃冰箱儲放。如此再經過半年，再進行第二次的油脂檢測分析。檢測分析項目包括酸價 (acid value; AV)、過氧化價 (peroxide value; POV)、油脂氧化安定性 (oil stability index; OSI)、還原力 (reducing power)，以及機能性成分維生素 E (vitamin E) 及總酚 (total phenols) 含量。

### 酸價與過氧化價分析

酸價 (AV) 分析法如作者先前發表報告 (Hsieh *et al*. 2013)，使用自動滴定儀 (auto-titrator 785 DMP Trino, Metrohm, Herisau, Switzerland)，操作流程依據儀器說明進行。過氧化價 (POV) 分析法是依據 American Oil Chemists' Society (AOCS) Official Method 965.33，使用油脂 2.50 g (標準方法用量的一半) 依據作者先前發表報告進行 (Hsieh *et al*. 2013)。苦茶油的國家品質標準 (Chinese National Standards) CNS 15827 是在 2015 年公告，一級油 AV < 1.5、POV < 6，二級油 AV < 3.0、POV < 10。

### 維生素 E 含量

以高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, 2695, Waters, Milford, MA, USA) 進行分析，分離管柱為 Inertsil ODS-3 (5 Liquid × 4.6 mm I.D., GL Sciences, Tokyo, Ja-

pan)，溫度 40℃，移動相為甲醇：乙腈 = 40 : 60 (均購自 Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)；流速設定為 1 mL $min^{-1}$，並使用螢光偵測器 (Multiwavelength Fluorescence Detector, 2475, Waters, Milford, MA, USA)。樣品製備是將油脂先以正己烷溶解，經過 0.45 μm 過濾膜 (polyvinylidene difluoride filter; PVDF filter) 進行過濾。配製 50、100、150 mg $mL^{-1}$ 維生素 E 標準品 (α-, β-, γ-, δ-tocopherol, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 以建立標準曲線 ($r > 0.99$，以內插法分析)。

### 油脂氧化安定指數

油脂氧化安定指數 (OSI) 分析方法同 Hsieh *et al*. (2013)，使用儀器 Rancimat Apparatus (873 Biodiesel Rancimat, Metrohm, Herisau, Switzerland) 分析。方法如下：精確秤取油脂樣品 3.00 g 置入油脂試樣管 (透明玻璃管) 中，將試樣管放入 110、120 或 130℃恆溫控制槽，同時通入 10 L $h^{-1}$ 空氣流，加速油脂樣品氧化，以偵測 OSI 數值 (hour)。其原理是應用油脂氧化過程中的三個階段：一、起始期 (initiation stage)， 開始出現小量氧化自由基，此時油脂中的抗氧化物質會很快消滅這些自由基，所以可以維持一段安定的時間；二、增殖期 (propagation stage)，此階段自由基 (不成對的電子) 的產生量太多，已經超過抗氧化物質可以消滅的數量，此時自由基不斷撞擊油脂分子，故造成新的自由基大量增生；三、終止期 (termination stage)，大量自由基發生彼此碰撞產生成對電子而開始安定下來至平靜 (Nawar 1996)。此儀器提供高溫與源源不絕的空氣，加速消耗油脂樣品中的抗氧化物質。在分析的過程中，將油脂樣品上空的氣體導入水中，持續偵測水導電度的變化。當油脂氧化進入增殖期時，揮發性氧化氣體如醛類、酮類等將大量產生，導致水中電導度急遽上升，油脂氧化安定指數是指導電度變化的轉折點，單位是 h。當 OSI 越高時，代表油脂越能耐受高溫與氧化環境，安定性越高 (Lampert 1999)。

### 總酚含量

檢測方法是依據 Singleton & Rossi (1965) 的研究方法加以修改，本試驗方法如 Hsieh *et al*. (2013)。標準曲線是沒食子酸 (gallic acid, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 以蒸餾水 ($ddH_2O$) 稀釋製備 (0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg $mL^{-1}$ gallic acid) 建立 ($r > 0.99$，以內插法分析)。

### 還原力

分析方法是依據 Oyaizu (1986) 發表的研究，如同作者先前的研究報告 (Hsieh *et al*. 2013)。標準曲線是以甲醇配製 trolox (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0、0.2、0.4、0.6、0.8 mM ($r > 0.99$，以內插法分析)。

## 結果

### 壓榨油產率

含水率 6.5% 及 12% 的小果油茶籽 (帶殼、無焙炒與水蒸過程) 榨油率分別為 22.5% ± 0.5% 及 21.3% ± 0.8%，顯示兩者無差異。

### 油脂酸價

酸價 (AV) 是指每公克 (g) 油脂，使用氫氧化鉀 (KOH) 滴定達到中和之毫克 (mg) 數。酸價越高，表示油脂中游離的脂肪酸含量越高，油脂品質越差。

試驗的 6 種油茶籽樣品代碼 (表 1) 分別表示含水率 6.5% 及 12% 的小果油茶籽，不同儲放溫度、處理的樣品，油脂分別有儲放半年、1 年兩個時間點的油脂樣品。酸價分析結果呈現於圖 1A。油茶籽 A1、A2 (含水率 6%) 分別儲放於 -20 及 4℃ 6 mo 後，所榨出之油脂再儲放半年 (4℃) 後的酸價均相近 (分別是 0.12 與 0.14)，且與新鮮油茶籽壓榨的油幾乎無異。由此顯示，只要不開封，半年過後猶如新鮮油。然而，A3 油茶籽儲放於 15℃ 6 mo 後其酸價 (0.39) 則高出前 2 種油茶籽油的 2–3 倍。而 12% 含水率的油茶籽 B1、B2、B3，酸價分別為 0.15、0.29、0.63，隨著儲放溫度上升而增加。各油品再經過半年 4℃儲放之後分析其酸價變化，結果顯示 6% 含水率、儲放於 -20、4、15℃的油茶籽 (A1−3) 油，數值上升至 0.63、0.87、0.85；12% 含水率者 (B1−3)，數值則分別上升至 0.32、0.65、1.07。此結果顯示，所有的油脂儲藏於 4℃，只要使用得當，1 年內，以酸價為標準，仍可達到一級油的國家標準。

從整體觀察，油茶籽的水分含量、儲放溫度，對於其壓榨油的酸價品質影響很大。油茶籽降低含水率以及於低溫保藏，都能獲得較低酸價的油脂。然而，B1 油茶籽 (較高含水率 12%、儲藏於 -20℃) 之壓榨油儲放 1 yr 後的酸價 (0.32)，卻是所有分析樣品中最低者。

## 油脂過氧化價

過氧化價 (POV) 是 1 kg 油脂中含有多少毫當量過氧化物 (milliequivalent of peroxide) 的數值。過氧化價越高，代表油脂氧化程度越高、品質越差，分析結果呈現於圖 1B。油茶籽 A1、A2、A3 (含水率 6.5%，儲放於 -20、4、15℃溫度下 6 mo)，榨出油放置於 4℃溫度下 6 mo 後，過氧化價分別為 3.2、3.7、8.4；前二者接近新鮮油茶籽榨出油，但是 A3 種子的壓榨油沒有達到國家一級油標準 (POV < 6)。油品經常開封、再經過 4℃溫度下 6 mo 儲藏，過氧化價升高至 4.6、9.4、18.3，大約是半年前的兩倍。另外，油茶籽 B1、B2、B3 (含水率 12%，儲放於 -20、4、15℃溫度下 6 mo) 過氧化價相似，數值大約是 5。但在之後開封使用後，經過半年 4℃溫度 6 mo 儲放，過氧化價大約升高 4 倍，達到 22−24，遠高於國家二級油標準 (POV < 10)。此結果顯示，A1 種子 (6% 含水率、-20℃儲藏) 榨出油儲放 1 yr (4℃) 後，具有最低的過氧化價 4.6，仍可達到國家一級油標準，而 A2 種子榨出油其過氧化價為 9.4，此時尚符合國家二級油標準。

## 油脂總酚含量與還原力

油脂中的酚類化合物可以提供抗氧化能力 (Singleton *et al*. 1999)。榨出油儲放 4℃半年後分析結果呈現於圖 1C。結果顯示，B 組的油茶籽 (含水率 12%) 所榨出油的總酚含量 [平均 0.019 Gallic acid equivalent (GA equi.) mg $mL^{-1}$]，不論種子的儲藏溫度，均顯著高於 A 組的油茶籽 (含水率 6.5%) 油 (平均 0.016 GA equi. mg $mL^{-1}$)。開封後再儲藏 6 mo (4℃)，總酚含量呈現下降趨勢，只有 A1 種子 (6% 含水率、-20℃儲藏) 榨出油幾乎沒有改變，而降低程度 A 組種子較小 (平均 0.012 GA equi. mg $mL^{-1}$)；對於 B2、B3 種子 (儲放於 4、15℃) 榨出油，此時僅剩半年之前的三分之一。相較之下，B1 種子 (儲放於 -20℃) 擁有相對較高的總酚含量 (0.013 GA equi. mg $mL^{-1}$)，大約是 B2、B3 種子榨出油的 2 倍。

油脂還原力分析結果呈現於圖 1D。不論種子含水率與儲藏溫度，壓榨油儲藏 6 mo (4℃) 開封時，還原力都十分相近，大約是 0.04 mM trolox。之後再經過 6 mo (4℃) 儲藏，還原力微幅下降至 0.03 mM trolox，除了 A1 種子 (6% 含水率、-20℃儲藏) 榨出油，其還原力仍維持不變。

## 維生素 E 含量

天然抗氧化劑維生素 E，分析結果呈現於圖 1E，顯示壓榨苦茶含有相當高的含量。苦茶油中存在的維生素 E 化學結構，是以 α- 生育酚 (α-tocopherol) 為主，占 80%。對於 A 群油茶籽 (含水率 6.5%)，不論種子含水率與儲藏溫度，壓榨油儲藏 6 mo (4℃) 開封時，其維生素 E 含量均相近 (約 370 μg $g^{-1}$ oil)。對於 B1、B2、B3 油茶籽 (含水率 12%)，儲放於 -20、4、15℃溫度下 6 mo 後，其維生素 E 含量分別為 400、360 與 300 μg $g^{-1}$ 油脂，顯示隨著儲放溫度提升而降低。

## 油脂氧化安定指數 (OSI)

油脂氧化安定指數的分析結果，可以作為油脂儲放耐受性的重要參考。本試驗以 Rancimat 方法分析，可以平行比較測試樣品，測得 OSI。分析結果呈現於圖 1F，顯示 A 組種子 (含水率 6.5%) 榨出油均稍高於 B 組種子 (含水率 12%) 榨出油。值得注意的是，OSI 受到種子儲藏溫度的影響顯著高於種子含水率的差異，不同儲藏溫度的油脂品質 -20℃ > 4℃ > 15℃。A1 與 B1 種子 (儲放於 -20℃) 顯著優於其他儲放溫度的種子榨出油。在 110℃溫度的氧化壓力下，A1 與 B1 種子榨出油的 OSI 分別為 9.8 h 與 9.0 h，顯著高於 A2、B2 種子的 6.9 h 與 5.9 h。此外，最穩定的油脂樣品是 A1 種子 (含水率 6.5%、儲放於 -20℃) 榨出油，其 OSI 在 110、120、130℃溫度的氧化壓力下，分別是 9.8、5.9、2.8 h。

# 討論

正儲型種子在成熟過程中，會經歷乾燥、含水率降低、代謝速度減緩、增加儲藏型的營

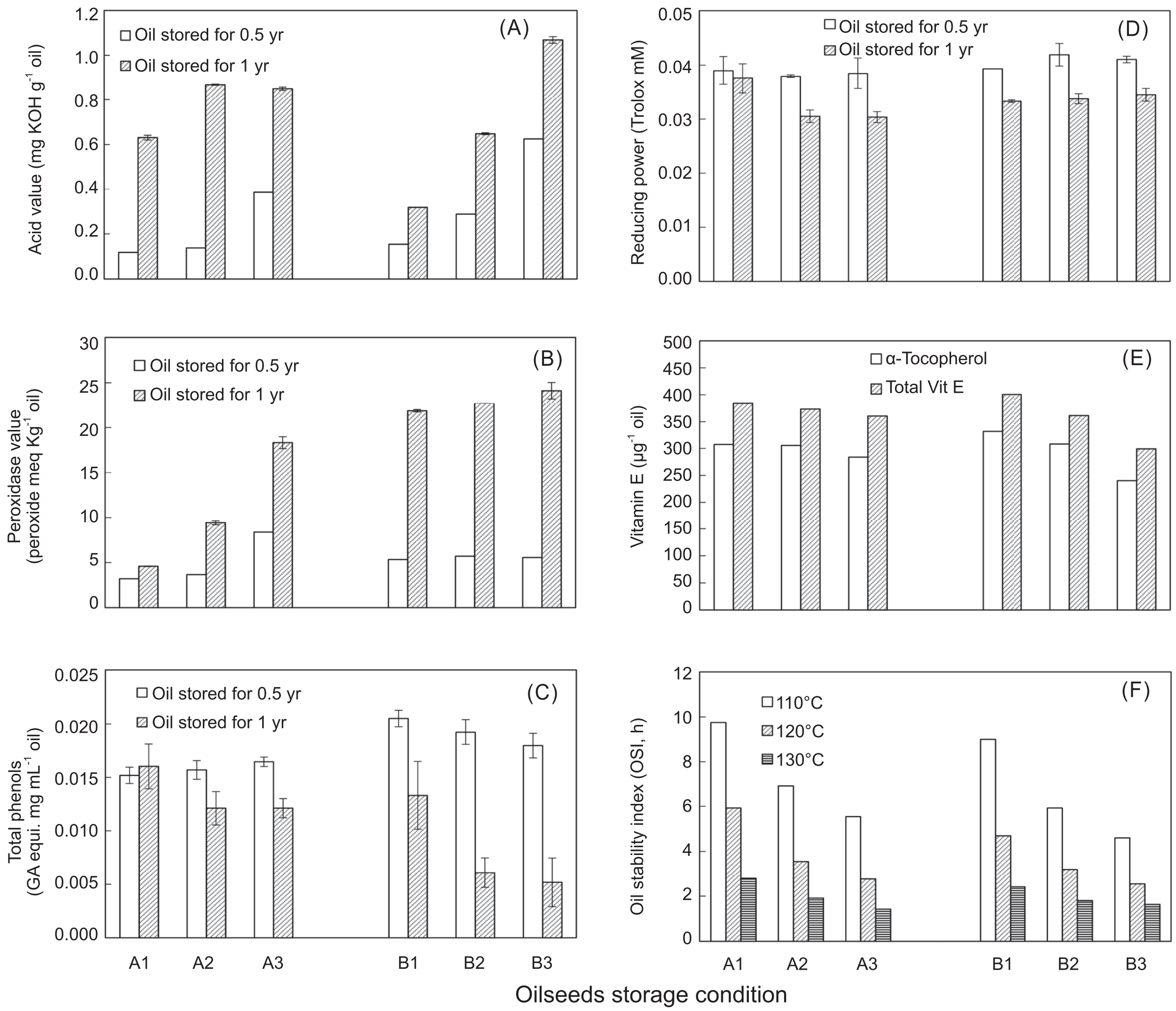



**圖 1.** 油茶籽儲藏於不同條件下 6 mo 後壓榨油之 (A) 酸價分析、(B) 過氧化價分析、(C) 總酚含量分析、(D) 還原力分析、(E) 維生素 E 分析、(F) 氧化安定指數分析。

**Fig. 1.** (A) Acid value, (B) peroxide value, (C) total phenols, (D) reducing power, (E) vitamin E content, and (F) oil stability index (OSI) of the pressed oil from camellia oil seeds stored at different conditions for 6 mo. Oils were stored at 4℃ for 6 mo (white bar) or 1 yr (striped bar). The capital letter "A" designates the oilseeds with moisture content 6.5%, and "B" 12%; the following number "1, 2 or 3" designates the oilseeds stored at -20, 4, or 15℃, respectively. The error bars are standard deviations representing duplicated experiments conducted.

養素成分，例如澱粉、脂質、蛋白質等等；其乾燥耐受強度，受限於能有效維持細胞膜的結構完整性，以及蛋白質不變性的能力，因此儲存於種子內的抗氧化也具有重要的貢獻 (Oliver & Bewley 1997)。然而，異儲型種子則與正儲型種子相反，不耐乾燥，在果實成熟時，種子含水率高，並且容易在乾燥過程發生組織傷害 (Roberts 1973)。若能加速其乾燥過程，則可以保有較高比例的活力種子 (發芽率較高) (Pammenter & Berjak 2000)。

一般而言，台灣油茶果實收穫後，會放在陽光下曝曬，使外果皮開裂後去除，當再繼續曝曬到含水率下降至 6–7%，此時可以榨油。但是，通常放置於室內通風陰涼處儲放，直到榨油廠可以提供榨油服務。依據市場需求供應產品是聰明的策略，所以研究種子最佳儲藏條件

以得到高品質的壓榨油，可以在豐收年時儲藏適量油茶籽，以待歉收年時壓榨俾利供需之平衡。目前在台灣已有某些盤商為了追求高品質的產品，會將油茶籽儲放在 -20℃溫度環境，有些則放在 4℃冰箱。一般的小農則主要是將乾燥後的油茶籽裝袋，放置在屋內的角落陰涼處，但是由於種子會隨環境中的相對濕度變化，最終將達到氣相平衡含水率。此外，台灣多雨的氣候環境下，空氣相對濕度相對較高，易造成種子回潮導致劣變發黴。異儲型種子活力深受含水率的影響，故以含水率分別為 23、17、12 及 6.5% 的種子進行試驗。結果發現，儲放於 15℃溫度下經過 6 mo 後，23% 與 17% 含水率的種子發生霉爛現象，所以決定選用含水率 12% 與 6.5% 的種子，儲放於 -20、4、15℃溫度下 6 mo 再進行榨油。此榨出油放入玻璃瓶中 9 分滿，密封後放置於 4℃冰箱 6 mo，之後開封取樣分析。此後，仿照一般家庭用油習慣放在4℃冰箱，偶爾開蓋取油，再經過 6 mo，即是壓榨油放置 1 yr 後，再次取樣分析，比較兩個時間點的油脂品質差異。

導致油脂酸價升高主要有兩種可能原因，其一，是油脂中的含水量高容易酸敗 (rancid)，其次，有可能是存在微量微生物所造成的影響。Zhou (1999) 研究報告顯示，粗榨芥菜油與花生油均含有微生物，物種包括細菌、酵母菌與黴菌，而這些油脂在儲放過程中之品質下降，包括酸價與過氧化價上升，與微生物含量、水分含量、儲放溫度呈現正相關。本研究的酸價分析顯示，來自含水率低的種子 (6.5%, A1−3) 榨出油，儲放半年後開封的油脂品質優於高含水率者 (12%, B1−3)。此結果符合一般的觀察與科學理論，因為水分含量高易促進脂肪酸水解。當榨出油在儲放 1 yr 之後，觀察高含水率 (12%) 的 B 組種子，其榨出油的酸價隨儲放溫度上升而上升。然而，B1 種子儲放於 -20℃之榨出油，則具有最低的酸價值 0.32，反觀 A1 種子 (含水率 6.5%、同樣儲藏於 -20℃) 榨出油則為 0.63。推測可能的原因，是因為此試驗使用冷壓製程，沒有經過殺菁處理 (例如較高溫之焙炒過程)，所以高含水率種子的微生物含量較高 (較適於微生物生長)。但是當種子儲藏於 -20℃冰溫下 (B1 種子)，因為這些種子含有較多的自由水 (free water molecules)，可能會產生較多的冰核 (ice nuclei)。這些冰核在冷凍過程逐漸形成冰晶 (ice crystals)，會剝奪較多維持微生物生長必要的水分，因而導致微生物在種子儲藏過程中死亡，使得 B1 種子油儲放 1 yr 後酸價最低 (相對於 A1 種子，B1 種子存活的微生物含量較低)。不論市售產品或是實驗室壓榨的油品，苦茶油儲放一段時間後，油瓶底部通常會出現淡黃色沉澱物，過去未有相關研究報告分析此物質，未來將研究是否含有微生物以及其可能種類，以瞭解是否有微生物存在而影響油脂儲藏品質下降之可能性。

另一項油脂品質指標過氧化價 (POV)，是表現油脂氧化的程度。分析結果顯示低含水率種子 (A1−3) 普遍含有較低的過氧化價，而高含水率種子 (B1−3) 榨出油在儲放 1 yr 之後，其過氧化價均 > 20，超過國家二級油的標準 2 倍。此結果顯示，油脂中的水分含量與油脂氧化反應有關，而此結果亦相同於 Zhou (1999) 之報告，油脂氧化主要是非生物性因素 (惟仍與油脂中的微生物含量呈現正相關)。Akinoso *et al.* (2010) 報告，較高含水率的胡麻籽榨出油過氧化價也較高。再者，玉米油的研究顯示，油中的含水率較高，會加速油脂的氧化反應 (Park *et al.* 2014)。值得注意的是，含水率低的種子 (6.5%, A1−3)，其榨出油經過 1 yr 的儲放後，過氧化價的增加與種子儲放溫度呈現正相關。推測可能原因是，較高溫度下，種子的生理代謝速度亦較快，此包括呼吸作用與能量消耗，因此組織消耗了較多的抗氧化物質，導致之後壓榨油的儲藏過程中過氧化價上升速度較快。推論是種子儲藏於較低溫度下，其壓榨油在開封後的儲放過程中，能維持較佳/低的過氧化價 (A1−3 種子油儲放 1 yr 後之過氧化價)。

觀察油脂總酚含量與還原力，顯示未開封之前的所有油脂數值均相近，除了高含水率種子 (B1−3) 的榨出油總酚含量稍微高於其他分析樣品。在 1 yr 低溫儲藏之後，大部分的油脂樣品都微幅下滑，僅除了 A1 種子 (含水率 6.5%、儲放於 -20℃)，它與半年前油瓶剛開封時相同。此結果可能是因為在儲放過程中，此種子擁有最低的生理代謝速度與氧化壓力，使得它擁有較多的抗氧化物質儲量，此亦呼應此油儲放 1 yr

後具有最低的過氧化價 (4.6)。另一方面，含有高含水率 (12%) 的種子 B1–3，特別是儲放於較高溫度者 (4、15℃)，它們的油儲放 1 yr 後，其中的總酚含量與還原力顯著較低，推測含水率高的種子代謝速度亦較快，因而消耗較多的抗氧化物質。當考慮油脂在家庭使用過程中的氧化安定性時，油脂氧化安定指數 (OSI) 是一個十分合適的參考指標。OSI 分析結果顯示，油茶籽儲放溫度的影響高於含水率的影響—種子儲放溫度越低，其榨出油氧化安定性越高。其可能原因，如同上述儲藏過程中，低溫下的種子抗氧化物質儲量較高 (因為生理代謝速度較低)，所以其壓榨油的 OSI 較高 (油脂氧化安定性較高)。

苦茶油中維生素 E 的結構，以 α- 生育酚 (α-tocopherol) 為主，占有 80%，此為人體必需營養素，它維持細胞上的脂質正常功能。美國國家科學院醫學研究所食物與營養委員會 (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences) 建議每個成年人，每天應該從天然食物中攝取至少 15 mg 維生素 E。本研究結果顯示，攝取 4 mL 苦茶油可以達到建議成年人每日攝取量的 10%。

## 結論

油茶籽的儲放條件確實會影響榨出油的品質，以及其開封後居家使用期間的品質變化。研究結果建議油茶籽必須乾燥至低含水率 (例如 6.5%)，並且保存於 ≤ 4℃的溫度環境，如此可以預期其壓榨油達到國家一級苦茶油的標準；如果油茶籽保存於 -20℃環境，則可預期其壓榨油開封後的居家使用期間，在適當取用與儲藏習慣下 (確實密封後放置於 4℃冰箱中)，能夠持續維持至少半年以上的高品質油脂 (維持國家一級油標準)。

## 誌謝

本研究是由行政院農業委員會科技計畫 (104AS-18.3.1-CI-C1、105 農科 -15.3.1- 森 -G1) 支持下完成。作者特別感謝王益真博士 (前林業試驗所木材纖維組研究員兼組長) 對報告內容的討論與提供意見。

## 引用文獻

Akinoso, R., S. A. Aboaba, and T. M. A. Olayanju. 2010. Effects of moisture content and heat treatment on peroxide value and oxidative stability of un-refined sesame oil. Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev. 10:4268–4285.

Hsieh, C. M., J. C. Yang, Y. C. Chuang, E. I. C. Wang, and Y. L. Lee. 2013. Effects of roasting prior to pressing on the Camellia oil quality. J. Taiwan Agric. Res. 62:249–258.

Kris-Etherton, P. M. 1999. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. Circulation 100:1253–1258.

Lampert, D. 1999. High-stability oils: What are they? How are they made? Why do we need them? p.238–246. *in*: Physical Properties of Fats, Oils, and Emulsifiers. (Widlak, N., ed.) AOCS Press. Champaign, IL. 260 pp.

Nawar, W. W. 1996. Lipids. p.255–314. *in*: Food Chemistry. 3rd ed. (Fennema, O. R., ed.) Marcel Dekker. New York. 1069 pp.

Oliver, M. J. and J. D. Bewley. 1997. Desiccation-tolerance of plant tissues: A mechanistic overview. p.171–213. *in*: Horticultural Reviews. Vol. 18. (Janick, J., ed.) Wiley. New York. 379 pp.

Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn. J. Nutr. Diet. 44:307–315.

Pammenter, N. W. and P. Berjak. 2000. Aspects of recalcitrant seed physiology. Rev. Bras. Fisiol. Veg. 12:56–69.

Park, J. W., J. Y. Kim, M. J. Kim, and J. H. Lee. 2014. Evaluation of oxygen-limitation on lipid oxidation and moisture content in corn oil at elevated temperature. J. Amer. Oil Chem. Soc. 91:439–444.

Roberts, E. H. 1973. Predicting the storage life of seeds. Seed Sci. Technol. 1:499–514.

Sales-Campos, H., P. R. Souza, B. C. Peghini, J. S. da Silva, and C. R. Cardoso. 2013. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. Mini. Rev. Med. Chem. 13:201–210.

Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Meth. Enzymol. 299:152–

178.

Singleton, V. L. and J. A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Amer. J. Enol. Vitic. 16:144–158.

Zhong, H., D. R. Bedgood Jr., A. G. Bishop, P. D. Prenzler, and K. Robards. 2007. Endogenous biophenol, fatty acid and volatile profiles of selected oils. Food Chem. 100:1544–1551.

Zhou, J. 1999. The role of microorganisms in deterioration of vegetable oil and measures of controlling. p.288–292. *in*: Proceedings of the 7th International Working Conference on Stored-product Protection. October 14–19, 1998. Beijing, China. Sichuan Publishing House of Science and Technology, Chengdu, China.

# Influence of Storage Conditions of *Camellia brevistyla* Seeds on the Quality of Pressed Oils

Ching-Ming Hsieh[1], Jeng-Chuann Yang[2], Huu-Sheng Lur[3], Yao-Chun Chuang[4], Kuang-Ping Hsu[5], and Ya-Lin Lee[6,*]

## Abstract

Hsieh, C. M., J. C. Yang, H. S. Lur, Y. C. Chuang, K. P. Hsu, and Y. L. Lee. 2018. Influence of storage conditions of *Camellia brevistyla* seeds on the quality of pressed oils. J. Taiwan Agric. Res. 67(3):292–300.

*Camellia brevistyla* is an indigenous Taiwanese camellia tree. After harvested, the seeds were dried immediately to a moisture content of 6.5% or 12%. Then, the seeds were stored at conditions of -20, 4, or 15℃ for 6 mo before pressed for oil. Following pressing, all the oils were sealed in glass bottles and preserved at 4℃ for 6 mo, and then subjected to analyses of acid value (AV), peroxide value (POV), phenolic content, reducing power, vitamin E content, and oxidative stability. Results indicated that all the oils were comparable to the freshly pressed ones, retaining good edible quality with the evaluation standards of AV < 1.0 and POV < 20 and the common food grade pressed oil standard. All these oil samples were continually kept at 4℃ for another 6 mo storage and then subjected to reanalyzing. During this period, occasionally opening of and withdrawing some oils from the bottles were conducted to imitate a common household habit. The results indicated that the oils from seeds with lower moisture content (6.5%) and stored at temperatures below 4℃ had a better quality. Besides, the oil from seeds stored at the lowest temperature -20℃ had the best oxidative stability, which still attained the first grade camellia tea oil quality as stipulated in the national standard (AV < 1.5, POV < 6). Its phenolic content and reducing power showed the least reduction from those at the moment when unsealing (6 mo ago).

**Key words:** *Camellia brevistyla* seed, Oilseed storage condition, Moisture content of seed, Storage temperature, Oil quality.

---

Received: December 19, 2015; Accepted: March 23, 2018.
[*] Corresponding author, e-mail: ylleet@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Silviculture Division, Taiwan Forestry Research Institute, Taipei, Taiwan, ROC.
[2] Associate Research Fellow, Botanical Garden Division, Taiwan Forestry Research Institute, Taipei, Taiwan, ROC.
[3] Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.
[4] Research Assistant Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[5] Contracted Assistant Research Fellow, Wood Cellulose Division, Taiwan Forestry Research Institute, Taipei, Taiwan, ROC.
[6] Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(3):301–308 (2018)
DOI:10.6156/JTAR.201809_67(3).0007

**Short Communication**

# Immunogenicity of Tobamovirus Universal Antibodies Raised Against Expressed Protein Encoded by a Synthetic Polynucleotide Containing Epitope Genes of ToMV, ORSV, and CGMMV

Chien-Ming Chou[1], Chun-Tao Chen[2], Chin-Hui Tsai[3], Chin-Chih Chen[1], and Ting-Chin Deng[4,*]

## Abstract

Chou, C. M., C. T. Chen, C. H. Tsai, C. C. Chen, and T. C. Deng. 2018. Immunogenicity of tobamovirus universal antibodies raised against expressed protein encoded by a synthetic polynucleotide containing epitope genes of ToMV, ORSV, and CGMMV. J. Taiwan Agric. Res. 67(3):301–308.

Using of synthetic peptide immunogens to produce antibodies with universal immunogenicity are a useful tool for diagnosis of plant viral diseases. Addition to the coat protein (CP) gene of *Tomato mosaic virus* (ToMV), we adopted the CP gene containing the predicted epitope sequences of *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) and *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) to assemble into a fused polynucleotide. A total of 1,136 bases of synthetic nucleotides were joined covalently and created a recombinant plasmid cloned in the vector of pUC57 in *Escherichia coli*. The protein containing peptides encoded by the synthetic polynucleotide was expressed by the vector pET-28a. After purification, this expressed protein was used to immunize a New Zealand rabbit for production of a polyclonal antiserum. By Western blot, such an antiserum reacted with corresponding virus was examined for immunological properties and the coverage of antigenic universe. As the antiserum was applied to indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), every tobamovirus tested in this study was detectable by the universal antibodies, but *Hibiscus latent Singapore virus* (HLSV) was an exception. A single reagent can detect a variety of tobamoviruses simultaneously; therefore, it can be practically applied to quarantine inspection and productions of Solanaceous seeds, Cucurbitaceous seeds, and some ornamental vegetative propagules.

**Key words:** Virus, Coat portion, Immunogen, Polyclonal antiserum, Western blot.

## INTRODUCTION

The genus *Tobamovirus* of the family *Virgaviridae* consists of 37 accepted species of plant viruses [ICTV Online (10th) Report, https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/]. Most species are pathogens to important crops and cause yield losses in nature. Some of tobamoviruses previously known as strains of *Tobacco mosaic virus* (TMV) are now defined as separate species according to their nucleotide sequence identities, host ranges, and antigenic relationships (Adams *et al*. 2017). Co-diverged with their hosts, tobamoviruses have been classified into 3 clusters: subgroup 1 includes those infecting Solanaceous plants,

Received: October 24, 2017; Accepted: December 19, 2017.
* Corresponding author, e-mail: tcde@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Associate Technical Specialist, Hsinchu Branch, Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Taoyuan, Taiwan, ROC.
3 Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
4 Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

subgroup 2 includes those infecting cucurbits and legumes, and subgroup 3 includes those infecting crucifers (Lartey *et al*. 1996). Tobamoviruses are not practically vector-transmissible, however, they have been spread globally and cases of seed-transmission occur very often. Therefore, certifications of 'tobamovirus-free' are required by quarantine authorities when the plant materials, especially seeds, move internationally. There are 7 tobamoviruses listed as A2 quarantine pests in Taiwan. In border inspection, a broad-spectrum, simple, rapid, sensitive, and accurate method for detection of tobamoviruses is an ongoing requirement. Seed producers also need the user-friendly, liable, and wide effective detection tools for self-inspection during the growing and after the harvesting of seeds. For this purpose the universal antibodies may be provided as the diagnostic reagents.

Tobamovirus generally has stable rod-shaped virions and strong immunogenicity, such as TMV, which elicits antibodies to cross-react with many heterologous viral antigens (Bar-Joseph & Salomon 1980). However, some other species of this genus are still serologically distinct (Adkins *et al*. 2003). Tobamoviruses have a single-stranded RNA non-segmented genome with 6.3–6.6 kb in size. The downstream open reading frame (ORF) encodes the 17–18 kDa coat protein (CP), which is expressed from 3'-terminal subgenomic mRNAs. In this study, the predicted epitopes encoded by CP gene of *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) and that of *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) were adopted to assemble into the CP gene of *Tomato mosaic virus* (ToMV) to produce multivalent antibodies. The immunological properties and the coverage of antigenic universe of the antibodies are revealed in the experiment.

## SCHEME OF SYNTHETIC POLYPEPTIDE

The coat protein sequences of ToMV (Accession No. AJ132845.1), ORSV (Accession No. AF405727.1), and CGMMV (Accession No. KJ754196.1) were adopted from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) for this study. From the Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB), the sequences of epitope peptides of ORSV and CGMMV were searched by program of "Antibody Epitope Prediction" (http://tools.immuneepitope.org/bcell/) and the Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity results shown in Table 1.

**Table 1.** Epitope peptides found in coat proteins of *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) and *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV)[z].

| Virus | Start position | End position | Peptide sequence[y] | Peptide length |
|---|---|---|---|---|
| ORSV | 10 | 17 | KLAYLSSA | 8 |
| | 24 | 34 | LINL<u>CTN</u> | 7 |
| | 46 | 59 | <u>QQQFADVWQPVPTL</u> | 14 |
| | 69 | 85 | <u>YFRVYRYDPILDPLITF</u> | 17 |
| | 119 | 126 | DATVAIRS | 8 |
| | 143 | 148 | NQVSFE | 6 |
| CGMMV | 8 | 32 | PSKLIAFSASYVPVRTLLNFLVASQ | 25 |
| | 49 | 59 | <u>LSALPSSVVDI</u> | 11 |
| | 69 | 86 | <u>YAFLNGPVLRPIFVSLLS</u> | 18 |
| | 94 | 100 | <u>VIEVVDP</u> | 7 |
| | 136 | 142 | <u>GFDVYDR</u> | 7 |
| | 148 | 154 | <u>AFS</u>VVWS | 7 |

[z] Searched by program of "Antibody Epitope Prediction" (http://tools.immuneepitope.org/bcell/).
[y] Epitope sequences assembled into the synthetic polypeptide (shown in Fig. 1) are marked with underlines.

The fragments of coat protein genes located at amino acid sequence of 82–378 of ORSV and that of 118–450 of CGMMV were adopted to join covalently with CP gene of ToMV. Resultant synthetic polynucleotide as shown in Fig. 1, in a total of 1,136 bases, nucleotides before sequence 485 were derived from ToMV CP gene, sequence 492–788 were from ORSV, and sequence 795–1,127 were from CGMMV. The recombinant plasmid was created with the vector of pUC57 then cloned in *Escherichia coli*. The vector is 2,710 bp in length, containing a

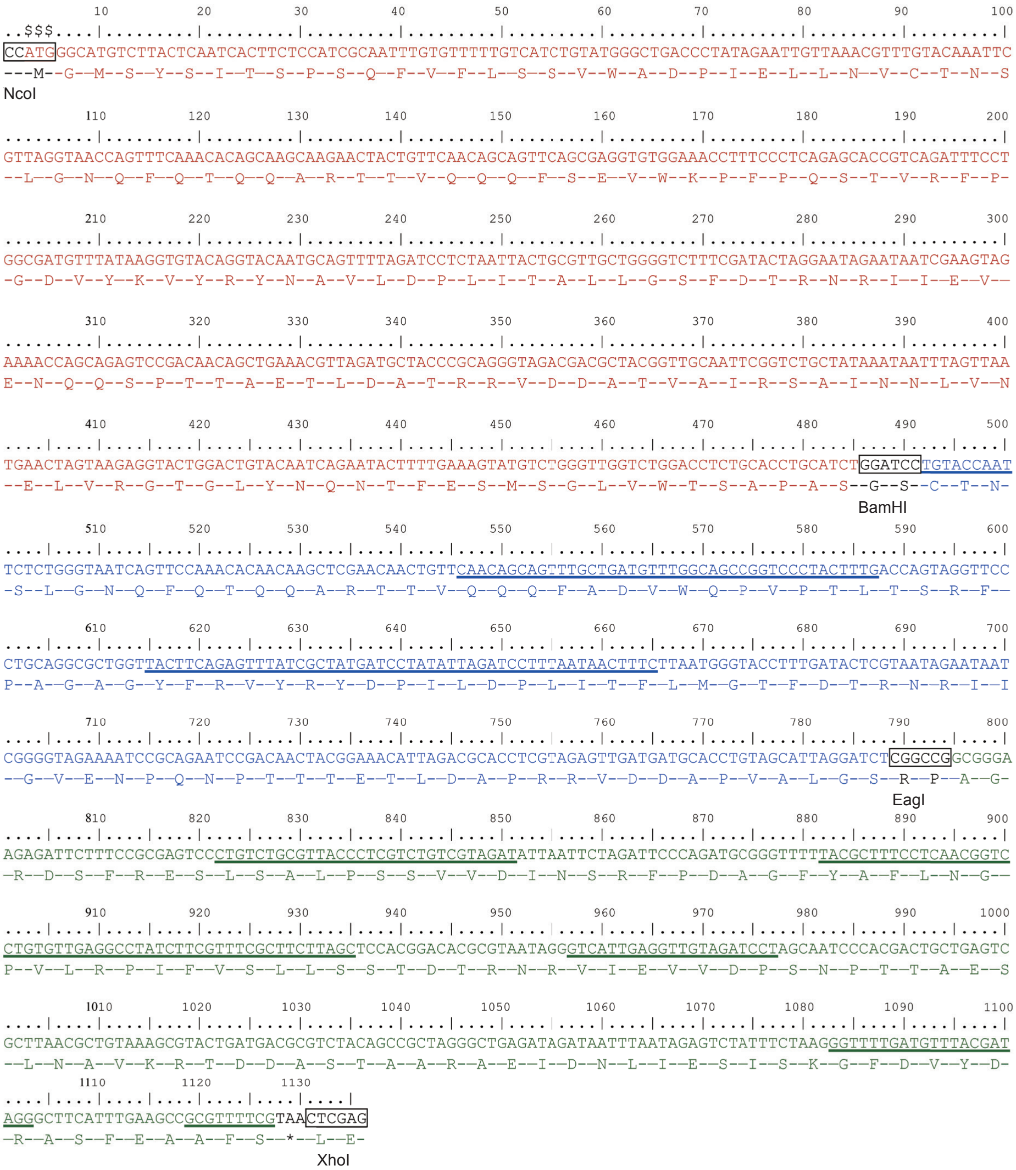



**Fig. 1.** Scheme of 1,136 bases of synthetic nucleotides encoding the polypeptide as immunogens used in this study. Nucleotide sequences before 485 are derived from coat protein (CP) gene of *Tomato mosaic virus* (ToMV), sequences 492–788 are from *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), and sequences 795–1,127 are from *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV). Sequences encode epitopes presented in each fragments are marked with underlines, and restriction sites are marked with boxes.

*bla* gene for ampicillin resistance and a *lacZ* gene for white/blue selection. In the study, the synthetic polynucleotide was purchased from Protech Technology Enterprise Co., Taipei, Taiwan by a specialized contract.

## PROTEIN EXPRESSION AND ANTISERUM PRODUCTION

Followed by an overnight digestion with NcoI and XhoI at 37℃, the synthetic polynucleotide in the vector of pUC57 was cleaved and transferred to the vector of pET-28a. The subcloned plasmid in DH5α competent cell was cultured by lysogeny broth (LB) medium with adding of Kanamycin 50 μg $mL^{-1}$. After an overnight culture and transformation, the plasmids digested with NcoI and XhoI were checked for nucleotide sequence. A total of 1,128 bases of nucleotide cleaved from the vector were identical to that in pUC57 as original design. The schemed proteins encoded by these sequences were expressed by the vector pET-28a. The cloning and the expression systems were provided by Protech Technology Enterprise Co., Taipei, Taiwan. After purification, this expressed protein was used as an immunogen to immunize the New Zealand rabbit for production of polyclonal antiserum by Protech Technology Enterprise Co. From the resultant antiserum, immunoglobulin G (IgG) was purified and used in subsequent experiments.

## VIRUS ISOLATES

The following tobamovirus isolates and their corresponding antisera shown in previous studies were collected, including CGMMV (Deng *et al.* 2013), *Hibiscus latent Singapore virus* (HLSV) (Deng *et al.* 2011), ORSV (Chang & Pang 1990), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) (Deng *et al.* 2014), *Plumeria mosaic virus* (PluMV) (Deng *et al.* 2015), TMV (Liao *et al.* 2007), ToMV (Deng *et al.* 2012), and *Wasabi mottle virus* (WMoV) (Deng *et al.* 2016). All the tobamovirus isolates were inoculated to *Chenopodium quinoa* Willd. and the virus-infected sap extracts were used for antigen preparation. The antisera tested were prepared in a laboratory at Taiwan Agricultural Research Institute except the diagnostic kits of PMMoV which was supplied by AC Diagnostics, Inc., Fayetteville, AR, USA.

## WESTERN BLOT

As described by Towbin *et al.* (1979), tested virus coat proteins were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electro-transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane with transferred proteins was blocked, incubated with a primary antibody, washed, incubated with a conjugated secondary antibody, and washed again. The primary antibody is specific for the virus species tested and the secondary antibody was that of goat anti-rabbit antibody conjugated to alkaline phosphatase (AP) for subsequent detection. Colorimetric detection of alkaline phosphatase activity was tested by 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) in conjunction with nitro blue tetrazolium (NBT). Blot images of various viruses detected by antibodies to PMMoV, TMV, ToMV, CGMMV, ORSV, WMoV, and HLSV, and the expressed immunogen was documented and shown in Fig. 2. Analyses of the relative signal intensities and molecular weights in these images reveal the antigenic property of each antibody reacted with 8 different tobamoviruses. Although CGMMV is serologically distinct from other tobamoviruses tested, the virus has become to be detectable by the antibodies raised from the expressed protein as the original scheme. Moreover, the universal antibodies have extended the coverage of antigenic universe to PMMoV, TMV, ToMV, WMoV, CGMMV, ORSV, HLSV, and PluMV with equivalent intensities, except HLSV. The unique serological relationships between HLSV and other tobamoviruses had also been indicated by Adkins *et al.* (2003).

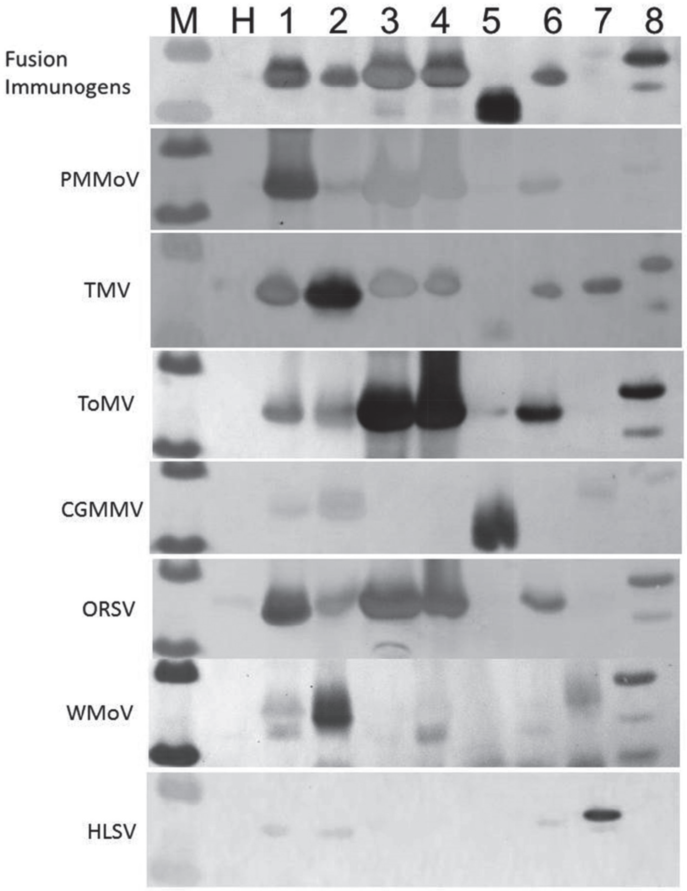



**Fig. 2.** Results of Western blot using antibody to "Fusion immunogens," *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), Tobacco mosaic virus (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), *Wasabi mottle virus* (WMoV), and *Hibiscus latent Singapore virus* (HLSV) on each row. The tested antigens are indicated on the top of each lane: M (molecular marker), H [healthy creatine kinase (CK)], 1 (PMMoV), 2 (TMV), 3 (ToMV), 4 (WMoV), 5 (CGMMV), 6 (ORSV), 7 (*Hibiscus latent Singapore virus*, HLSV), and 8 (*Plumeria mosaic virus*, PluMV).

## INDIRECT ELISA

The indirect ELISA was performed as previously described by Koenig (1981) using 96-well polyvinyl microtiter plates. Per well was coated with 0.1 mL of antigen prepared by extracting crude sap of virus infected leaves in coating buffer. The primary antibody is specific for the virus species tested and the secondary antibody was the same as used by Western blot. ELISA set for detection of *Ribgrass mosaic virus* (RMV) was used as reference control, which was provided by DSMZ, Braunschweig, Germany. All of the antigens were tested at the same time with duplications. Nearly, every tobamovirus tested in this study is detectable by the universal antibodies, but HLSV is an exception (Table 2).

## CONCLUSIONS

The immunological properties of resultant antiserum developed in this study showed that the synthetic polynucleotide containing epitope genes of 3 tobamoviruses had extended the coverage of antigenic universe as original

**Table 2.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) values ($A_{405nm}$) of various tobamoviruses reacted with universal antibodies.

| | Antigen | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Antibody to | HCK[z] | PMMoV | TMV | ToMV | CGMMV | ORSV | WMoV | HLSV | PluMV | RMV |
| Tobamo | 0.000 | 0.243 | 0.204 | 0.878 | 1.438 | 0.878 | 1.305 | 0.096 | 1.054 | 0.616 |
| PMMoV | 0.000 | 0.611 | 0.012 | 0.173 | 0.059 | 0.111 | 0.252 | 0.079 | 0.030 | 0.067 |
| TMV | 0.177 | 0.257 | 0.149 | 0.222 | 0.031 | 0.163 | 0.363 | 0.281 | 0.229 | 0.787 |
| ToMV | 0.037 | 0.168 | 0.363 | 1.926 | 0.042 | 1.587 | 2.216 | 0.000 | 1.131 | 0.825 |
| CGMMV | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 2.233 | 0.000 | 0.000 | 0.082 | 0.051 | 0.013 |
| ORSV | 0.000 | 0.187 | 0.096 | 0.911 | 0.004 | 0.585 | 1.333 | 0.014 | 0.208 | 0.353 |
| WMoV | 0.105 | 0.114 | 0.152 | 0.150 | 0.197 | 0.197 | 0.301 | 0.277 | 0.191 | 1.103 |
| HLSV | 0.010 | 0.141 | 0.048 | 0.046 | 0.006 | 0.050 | 0.042 | 0.712 | 0.012 | 0.006 |
| RMV | 0.057 | 0.005 | 0.057 | 0.073 | 0.010 | 0.082 | 0.114 | 0.148 | 0.084 | 0.780 |

[z] Abbreviation, HCK: healthy creatine kinase; PMMoV: *Pepper mild mottle virus*; TMV: *Tobacco mosaic virus*; ToMV: *Tomato mosaic virus*; CGMMV: *Cucumber green mottle mosaic virus*; ORSV: *Odontoglossum ringspot virus*; WMoV: *Wasabi mottle virus*; HLSV: *Hibiscus latent Singapore virus*; PluMV: *Plumeria mosaic virus*; and RMV: *Ribgrass mosaic virus*.

scheme. Species of *Tobamovirus*, especially those with seed-transmissibility, are quarantine important in the world. A broad-spectrum, sensitive and accurate detection method is required by quarantine authorities and also by seed producers. If the universal antibodies were applied, tobamoviruses such as PMMoV, TMV, ToMV, WMoV, CGMMV, ORSV, HLSV, PluMV, and RMV were all detectable by indirect ELISA. As a single reagent can detect a variety of tobamoviruses simultaneously, it is a cost-effective way to test the existence of these viruses. Therefore, it will be practically applied to virus inspection in quarantine inspection and productions of Solanaceous seeds, Cucurbitaceous seeds, and some ornamental vegetative propagules.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by grants [103AS-10.2.2-BQ-B3, 104AS-10.4.1-BQ-B3, 105AS-10.4.1-BQ-B3(1), and 106AS-9.4.1-BQ-B3] of Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan, from 2014–2017.

## REFERENCES

Adams, M. J., S. Adkins, C. Bragard, D. Gilmer, D. Li, S. A. MacFarlane, S. M. Wong, U. Melcher, C. Ratti, K. H. Ryu, and ICTV Report Consortium. 2017. ICTV virus taxonomy profile: *Virgaviridae*. J. Gen.Virol. 98:1999–2000.

Adkins, S., I. Kamenova, D. Achor, and D. J. Lewandowski. 2003. Biological and molecular characterization of a novel tobamovirus with a unique host range. Plant Dis. 87:1190–1196.

Bar-Joseph, M. and R. Salomon. 1980. Heterologous reactivity of tobacco mosaic virus strains in enzyme-linked immunosorbent assays. J. Gen. Virol. 47:509–512.

Chang, C. A. and J. H. Pang. 1990. Preparation of antisera against *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* and their uses in serological indexing for orchid industry in Taiwan. Plant Prot. Bull. 32:336. (abstract in Chinese)

Deng T. C., C. T. Chen, C. H. Tsai, F. Y. Ning, and Y. H. Cheng. 2014. *Pepper mild mottle virus* detected in pepper seeds for exporting quarantine test. Plant Pathol. Bull. 23:196–197.

Deng, T. C., M .C. Chen, C. H. Tsai, Y. T. Lin, and J. Y. Liao. 2011. The occurrence of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* and *Hibiscus latent Singapore virus* in Malvaceae plants in Taiwan. p.V05. *in*: 2010 Annual Meeting of Taiwan Phytopathological Society. March 25–26, 2011. Taichung, Taiwan. Taiwan Phytopathological Society, Taichung, Taiwan. (in Chinese)

Deng, T. C., Y. T. Lin, C. H. Tsai, J. Y. Liao, Y. H. Cheng, Z. H. Lee, C. C. Shih, and Y. C. Chen. 2012. Identification and occurrence of a *Tomato mosaic virus* infecting pepino (*Solanum muricatum*) plants in Penghu,

Taiwan. Plant Protect. Bull. 54:47–64. (in Chinese with English abstract)

Deng, T. C., C. H. Tsai, Y. H. Chien, M. J. Lin, and M. Y. Chen. 2015. Chacterization of a tobamovirus isolated from desert rose (*Adenium obesum*) in Kaohsiung, Taiwan. Plant Pathol. Bull. 24:152–153. (in Chinese)

Deng, T. C., C. H. Tsai, and F. Y. Ning. 2016. Identification of *Wasabi mottle virus* infecting wasabi in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 65:103–108. (in Chinese with English abstract)

Deng, T. C., C. H. Tsai, H. L. Tsai, J. Y. Liao, and Y. H. Cheng. 2013. Detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* carried by seeds of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* L.). Seed Nursery (Taiwan) 15:37–56. (in Chinese with English abstract)

Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 55:53–62.

Lartey, R. T., T. C. Voss, and U. Melcher. 1996. Tobamovirus evolution: Gene overlaps, recombination, and taxonomic implications. Mol. Biol. Evol. 13:1327–1338.

Liao, J. Y., C. C. Hu, J. L. Kao, and T. C. Deng. 2007. Identification of *Tobacco mosaic virus* infecting *Rehmannia glutinosa*. Plant Pathol. Bull. 16:61–69. (in Chinese with English abstract)

Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:4350–4354.

# 以含 ToMV、ORSV 及 CGMMV 表位基因的合成聚核苷酸所表現的蛋白製備 Tobamovirus 廣效性抗體的抗原性

周建銘[1] 陳君弢[2] 蔡錦慧[3] 陳金枝[1] 鄧汀欽[4,*]

## 摘要

周建銘、陳君弢、蔡錦慧、陳金枝、鄧汀欽。2018。以含 ToMV、ORSV 及 CGMMV 表位基因的合成聚核苷酸所表現的蛋白製備 Tobamovirus 廣效性抗體的抗原性。台灣農業研究 67(3):301–308。

利用合成肽當免疫體原製備具有廣效的抗體，是一種實用的植物病毒診斷工具。我們設計以番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*; ToMV) 鞘蛋白基因序列為主體，加上齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*; ORSV) 及胡瓜綠斑嵌紋病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus*; CGMMV) 含表位基因的部分核苷酸序列，組裝成一聚核苷酸。合成聚核苷酸總共由 1,136 個鹼基共價連接，以質體轉殖到大腸桿菌中的 pUC57 載體中，再轉殖到 pET-28a 載體生產表現蛋白，經純化的表現蛋白用以注射白兔生產多原抗血清。利用西方墨漬法 (Western blot) 分析，可檢驗本研究所生產的抗血清與相對應病毒反應的免疫特性及抗原廣效性。製成酶聯抗體免疫酵素分析 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 試劑，以間接法試驗，除 *Hibiscus latent Singapore virus* (HLSV) 以外，所有供試 tobamoviruses 都可有效被檢出。由於一種試劑即可同時檢出多種病毒，將可應用在檢疫或種苗生產時，茄科及葫蘆科種子或蘭花等觀賞作物繁殖體的病毒檢查。

**關鍵詞**：病毒、鞘蛋白、免疫體原、多原抗體、西方墨漬法。

---

投稿日期：2017 年 10 月 24 日；接受日期：2017 年 12 月 19 日。
[*] 通訊作者：tcde@tari.gov.tw
[1] 農業委員會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農業委員會動植物防疫檢疫局新竹分局技士。台灣 桃園市。
[3] 農業委員會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。
[4] 農業委員會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(3):309–317 (2018)
DOI:10.6156/JTAR.201809_67(3).0008 研究簡報

# 利用夜間照光與割除枝葉以調控茭白筍採收期

黃晉興 [1,*]　蘇俊峰 [2]　陳泊菘 [3]

## 摘要

黃晉興、蘇俊峰、陳泊菘。2018。利用夜間照光與割除枝葉以調控茭白筍採收期。台灣農業研究 67(3):309–317。

「早生青殼」茭白 (*Zizania latifolia*) 是台灣最主要之商業栽培品種，以慣行栽培每一年有 2 個產期，分別為4–6月及7–10月。第一期作通常於1月初種植，若提早於12月初種植，通常結的筍很細小，無商業價值，俗稱『矮化症』。由生長箱的栽培試驗結果顯示，短日處理會促進茭白結筍，長日處理則有抑制效果，幼苗對短日感應較為敏感，因此在茭白生長初期，於田間以人工光源進行夜間照光則可避免矮化症的發生。實際在田間將種植期提早 30 d，加上苗期夜間照光 60 d (12 h d$^{-1}$)，證實可較慣行農法提早約 20 d 採收。於第二期作採收後，進行排水及割除枝葉處理，可促使植株提早大量產生幼苗，這些幼苗配合夜間光照，同樣可正常結筍，可因此在冬季產生第三個採收期。此外，產期可進一步利用照光日數之加長或縮短來延後或加速結筍來進行產期微調。在商業栽培區之田間分區，以這些技術在不同時間進行處理，證實可由此發展出一年三產期的栽培技術，同時達到週年生產之結果。

**關鍵詞**：茭白、產期調控、週年生產。

## 前言

茭白 (*Zizania latifolia* Turcz.) 種植地區分布於亞洲東部，如俄羅斯、中國大陸、韓國、日本、台灣、東南亞國家以及印度等地 (Chan & Thrower 1980; Thrower & Chan 1980; Terrell & Batra 1982)，以中國大陸的栽培面積最大，有 100,000 ha 以上 (Jiang 2004)。數百年前中國大陸即有種植與採收茭白筍的記載，而且境內茭白品種眾多，主要區分為「單季茭」(single-season crop) 與「雙季茭」(two-season crop)，分別於春初與春末種植。前者僅於秋季採收 1 期，後者採收 2 期，主要產筍期在當年秋末與次年夏初。在中國大陸，由於冬季低溫期茭白生長停滯與休眠，單季茭於冬季休耕，而雙季茭之地下莖與根於土壤中越冬至次年春季生長 (Jiang 2004; Guo *et al*. 2007)。雖然茭白是多年生作物，但為了避免因持續宿根栽培而導致筍體內的黑穗菌孢子堆增多，影響商品價值，故現今多不宿根栽培，而以一年生的方式栽培茭白筍 (Jiang 2004)。

茭白筍在台灣又稱『水筍』或『美人腿』(Leu *et al*. 1977; Yang & Leu 1978; Lin 2005)，台灣茭白筍的栽培面積近 30 年來約有 1,500–3,000 ha，栽培的品種與方法據傳為 200 餘年前自中國大陸傳入 (Lin 1995)。近年來的品種有「早生青殼」(‘Green Shell Early’) 與「赤殼」(‘Red Shell’) 等 2 個品種 (Lin 2005)。「早生青殼」茭白品種為台灣栽培最多的品種，栽培面積估計約佔 80%，主要栽培地為南投縣埔里鎮。栽培期為 1–10 月，定植 90–100 d 後開始採收，有 2 個主要產筍期分別在 4–6 月 (第一筍期) 及 7–10 月 (第二筍期)，但 7 月高溫筍量明顯較少；「赤

投稿日期：2016 年 7 月 19 日；接受日期：2017 年 12 月 8 日。
* 通訊作者：jhhuang@tari.gov.tw
1 農業委員會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
2 農業委員會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
3 農業委員會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

殼」品種栽培期為 3–11 月，只在 9–11 月有 1 產筍期 (Lin 2005)。該 2 種茭白筍品種皆在冬季休耕，而產量高的時期價格低，反之則產量低的時候價格高，高低價格可有數倍的差異 (Lin 1995)。為提高台灣冬季與春季茭白筍產量，部分農民搶早在 11–12 月種植，然而經常造成定植後不到 40 d 即異常結筍，筍體細短，毫無商品價值，且不利第一期筍的生產 (Lin 1995)。然而在 2001 年 1–2 月，埔里地區於正規時期所栽種的茭白植株出現大規模幼苗異常結小筍的現象，稱之為『矮化症』(Huang *et al*. 2009; Huang & Ann 2016)，估計當年約有 500 ha 茭白田發生此病害。經由研究結果顯示，此病害乃是茭白植株在長夜季節的生理反應，而夜間照光可以完全防治此病害 (Huang & Ann 2016)。本研究以夜間照光預防矮化症，配合筍期末排水並割除枝葉，研發茭白筍採收期調控之栽培方法。

## 材料與方法

### 供試植株之栽培

本試驗之供試茭白植株如無特別說明均為「早生青殼」品種。

盆缽栽培：自南投縣埔里鎮田間取回苗齡 45–60 d 之茭白植株，從整叢植株取出部分分櫱苗 (含根) 移植至盛有 2.5 L 農試所田土與 2.5 L 地下水之圓柱形桶中 (直徑 24 cm，高度 30 cm)，去除三分之二長度的葉片而使株高低於 1 m，每桶種植 1 株 (約有 3–5 枝分櫱苗)，置於 24℃ (光照 12 h $d^{-1}$，光照強度為 51.7–70.3 μM $m^{-2}$ $s^{-1}$) 生長箱培養 7 d 後備用。

田間栽培：田間試驗地點為南投縣埔里鎮。使用來自前一期作的茭白結筍株製備而成的種莖 (Huang & Ann 2016)，經過築畦育苗 30 d 後，苗高 30–45 cm 即可植於試驗田，每公頃約種植 8,000 株 (叢)。慣行農法為 12 月上旬育苗 1 個月而於次年 1 月上旬移植，而其他處理之農法則可提早或延後育苗與移植。茭白植株可發育數十分枝而形成叢狀，試驗田維持浸水的狀態，視植株生長逐漸調高水位，於結筍期達到最高水位約 60–90 cm 深。自移植至試驗田後約 90–100 d 開始陸續結筍，結筍期間每 3–4 d 採收 1 次。採筍時，割除莖基部與枝葉而留下葉鞘包覆的筍體 (長約 30 cm) 秤重，視為茭白筍的產量。每 10 d 合計 1 次產量 (公斤/公頃，kg $ha^{-1}$)，記錄為每個月上、中及下旬產量。慣行農法將 3–6 月採收之茭白筍視為第一期筍，而 7–10 月採收視為第二期筍。

田間夜間照光：每公頃架設 20–30 盞高約 4–5 m 的高壓鈉燈 (220 V，400 W，地方商家自行組裝，台灣南投縣)，燈間距離約 20–30 m，照射角約朝下約 15–30 度。夜間自下午 6 點起，每夜照光 12 h，試驗田植株所受光量 > 0.5 μM $m^{-2}$ $s^{-1}$。每數日調整照射方位，以避免田區光強度不均勻 (圖 1A、B、C)。

### 生長箱栽培測試苗齡與光照時間長度對茭白筍結筍之影響

如前述栽植桶栽培方式製備供試植株，植株來自埔里田間苗齡分別約為 1.0–1.5 與 2.5–3

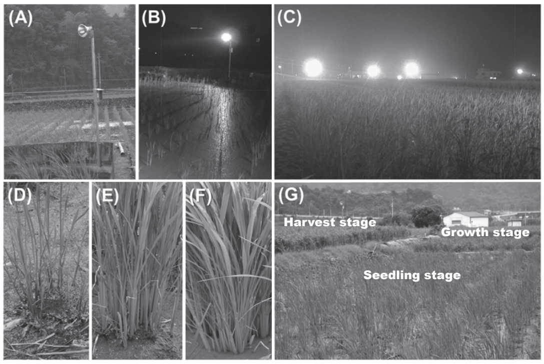



**圖 1.** 夜間照光及割除地上部枝葉對茭白生長影響之田間狀況。(A–C) 架設 400W 高壓鈉燈進行田間茭白夜間照光試驗情形；(D–F) 田區排乾水並割除地上部枝葉使茭白分櫱苗長出且生長成叢；(G) 試驗田內茭白筍產期調節，分別為幼苗期 (seedling stage)、生長期 (growth stage) 與採收期 (harvest stage) 田區。

**Fig. 1.** The experimental field indicating the effect of night lighting and shoots cut-off on growth of water bamboo. (A–C) The setting of lighting of 400W high pressure sodium lamps at night to regulate the growth of field grown water bamboo. (D–F) The regenerated clustering shoots of water bamboo after drainage and cutting off all the shoots from the underground stem clumps. (G) The field sections of plants at seedling, growth, and harvest stages represented the intra-field design for series of harvest time.

個月。爾後於 24℃ (光照強度為 51.7–70.3 μM $m^{-2}$ $s^{-1}$) 生長箱培養，而生長箱光照時數區分為 8、12 以及 16 h $d^{-1}$，每一處理 3 重複，每重複 5 盆，6 wk 後記錄結筍率。

### 早植並於苗期夜間照光對茭白生長之影響

試驗分為處理組 A、B 及對照 3 組，處理組 A 與處理組 B 較慣行農法提早 1 個月種植，皆於 2004 年 11 月上旬育苗且於 12 月上旬移植於試驗田。而對照組的慣行農法，則於 2004 年 12 月 1 日育苗而於 2005 年 1 月 1 日移植。處理組 A 夜間無照光，但處理組 B 自移植日起施以夜間照光 60 d，如前所述。每個試驗田區於 2 月下旬取 200 株植株記錄矮化症發病率，產量紀錄如前所述。

### 割除枝葉並於夜間照光對茭白生長之影響

田間試驗分為處理組與對照組 2 塊試驗田，於 2006 年 12 月上旬育苗而 2007 年 1 月上旬移植。處理組是在第一筍期末期 (5 月下旬) 將田水排乾，割除原植叢地上部的全部枝葉，留下土中的茭白莖基磐可再長出幼苗，稱之『再生苗』(圖 1D、E、F)。在再生苗長出後約 45 d 再復水，而於第二筍期末期 (10 月上旬) 同上述處理，並自再生苗長出後於夜間照光 12 h，共照光 60 d。對照組為慣行農法不排水也於夜間無照光，種植後產量依照前述紀錄。

### 夜間照光日數對茭白筍的採收期之影響

試驗分別在兩個不同月份進行，2009 年 8 月 15 日秋季初期 (A 及 B) 與 2009 年 10 月 15 日秋季末期 (C 及 D)。割除茭白地上部全部枝葉，使茭白莖基磐再長出再生苗，再施以夜間照光處理，A、B、C 以及 D 分別為 4 個不同的試驗田區。夜間照光處理分為 75 d (A 及 C) 或 90 d (B 及 D)，種植後記錄採筍時間，產量紀錄如前述。

### 茭白筍週年採收栽培流程之建立

田間試驗分為處理組 3 塊，與對照組 1 塊共 4 塊試驗田，於處理組不同塊田地不同月份割除枝葉與長夜季節夜間照光 60–75 d，以調控茭白筍採收期 (圖 1G)。於割除枝葉後約 90 d 採收，採收期約 30 d。A 產期調控第一區：於 2012 年 1 月割除地上部枝葉、排乾水 1 個月，使土中的茭白莖基磐長出再生苗，並夜間照光 60 d。5 月採收期後，重複前述方法割除地上部枝葉但不夜間照光，9 月採收期後相同處理方式，但再度夜間照光 75 d；B 產期調控第二區：分別於 2011 年 12 月、2012 年 4 月與 8 月割除地上部枝葉、排乾水 1 個月，僅於 12 月之處理夜間照光 75 d；C 產期調控第三區：分別於 2011 年 11 月、2012 年 3 月與 7 月上旬割除地上部枝葉、排乾水 1 個月，僅於 11 月之處理夜間照光 75 d；D 對照組 (慣行農法區)：2012 年 1 月移植而 10 月中旬結束。種植後記錄採筍時間與每個月上、中及下旬每 10 d 合計 1 次產量。

## 結果

### 苗齡與光照時間對茭白結筍之影響

在生長箱試驗中，不同光照對茭白筍結筍率影響之試驗中，苗齡約 1.5 個月茭白幼苗之結筍率隨光照時間增加而結筍率減低，於 8、12 及 16 h $d^{-1}$ 光照下幼苗結筍率分別為 79.2、4.5 以及 0.0%。而苗齡約 3 個月成株之結筍率，則分別為 76.2、61.5、50.0%，亦有隨光照時間增加而結筍率降低之趨勢 (表 1)。

### 早植及苗期夜間照光對茭白筍生長之影響

將種植期提早到前一年的 12 月，處理組 A (無夜間燈照) 及處理組 B (夜間照光) 的矮化症發病率，分別為 29.5% 及 0%，對照組 (慣行農

**表 1.** 光照時間長度與株齡對茭白筍結筍之影響。

**Table 1.** Effect of light duration and shoot age on gall formation of *Zizania latifolia* at 24℃ for 6 wk.

| Plant age (mo) | Light period (h $d^{-1}$) | Gall formation rate (%) |
|---|---|---|
| 1.5 | 8 | 79.2 a[z] |
| | 12 | 4.5 c |
| | 16 | 0.0 c |
| 3.0 | 8 | 76.2 a |
| | 12 | 61.5 b |
| | 16 | 50.0 b |

[z] Means followed by the same letters are not significantly different at $P < 0.05$ (least significant difference test; LSD Test).

法) 則為 0.5%。處理組 A 於 2 月中旬即開始產生少量畸型但尚有商品價值的茭白筍，直到 4 月上旬才有較正常的茭白筍產出，大量產筍的時期為 5 月；處理組 B 自 3 月中旬即有正常的茭白筍產出，大量產筍的時期為 4 月；對照組自 4 月上旬有正常的茭白筍產出，大量產筍的時期為 4 月下旬至 5 月中旬。第一期筍 (3–6 月) 產量由低至高分別為處理組 A 組 7.5 t $ha^{-1}$、對照組 9.7 t $ha^{-1}$、處理 B 組 11.8 t $ha^{-1}$；第二期筍 (7–10 月) 產量由低至高分別為處理 A 組 16.5 t $ha^{-1}$、處理 B 組 23.1 t $ha^{-1}$、對照組 23.3 t $ha^{-1}$ (圖 2)。顯示早植可以提早產期，但是會導致植株發生矮化症，若是配合夜間燈照，則可將產期提早並且避免矮化症之發生。

## 利用割除枝葉與施以夜間照光創造出第三期茭白筍採收期

處理組可有 3 次採收期，其產量分別為是分別為 12.1 t $ha^{-1}$、20.3 t $ha^{-1}$ 及 15.1 t $ha^{-1}$ (圖 3)；而對照組僅有兩次採收期，產量分別為 13.9 t $ha^{-1}$ 及 20.7 t $ha^{-1}$。處理組在第一及二採收期排水、割除植叢地上部後再生苗生長集中 (圖 1 D–F)，因此下一筍期採收收時間縮短為 1 個月。處理組第一筍期由於割除枝葉而放棄末期筍量，故產量低於照組 13.9 t $ha^{-1}$ 低，但處理組第二筍期產量沒有影響，且創造出 12 月下旬至 1 月下旬的第三產筍期。

## 利用夜間照光日數調控茭白筍的採收期

砍除地上部枝葉後給予夜間照光日數較長者，有較高的產筍量，但停止燈照到採筍時間也略微延長 (圖 4)。處理 A 組於 8 月 15 日給予處理 75 d，在停止夜間照光後約 17 d (11 月 15 日) 後開始採筍，採收 22 d 結束 (12 月 6 日 )，產量為 15.3 t $ha^{-1}$ (圖 4A)。處理 B 組的夜間照光日數為 90 d，在停止夜間照光後約 24 d (12 月 6 日) 開始採筍，採收 24 d 結束 (12 月 31 日)，產量為 20.4 t $ha^{-1}$ (圖 4B)。處理 C 組於 10 月 15 日

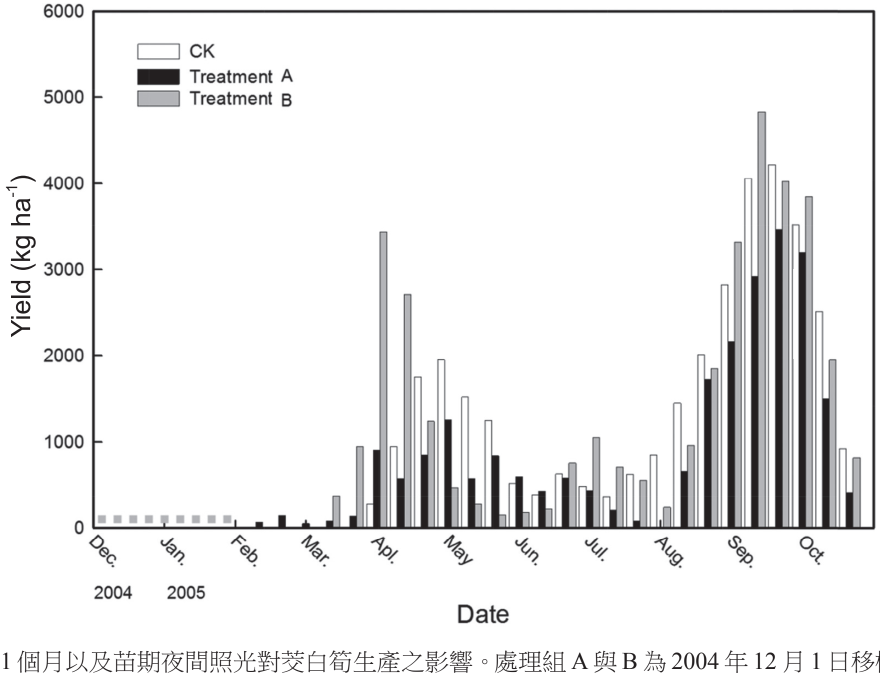



**圖 2.** 早植 1 個月以及苗期夜間照光對茭白筍生產之影響。處理組 A 與 B 為 2004 年 12 月 1 日移植 (Treatment A, B)，處理組 B 並自移植日起施以夜間照光 60 d (灰色橫虛線)。對照組 (CK) 為慣常栽培，於 2005 年 1 月 1 日移植。

**Fig. 2.** Effect of early planting and night lighting on the yield of water bamboo. Plants in treatments A and B were planted on December 1, 2004. Plants in treatment B were supplied with night lighting (12 h $d^{-1}$) for 60 d. Plants in control (CK) were planted on January 1, 2005 as ordinary cultivation.

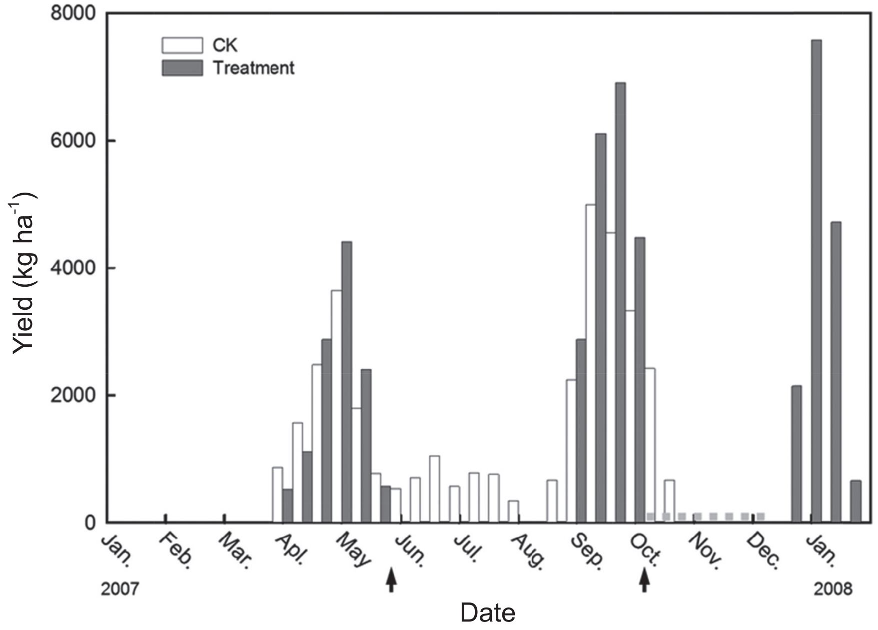



**圖 3.** 割除枝葉與施以夜間照光對茭白筍生長與採收期之影響。慣行栽培法 (CK) 與處理組 (Treatment) 皆為 2007 年 1 月 1 日開始移植，處理組在第一與第二筍期結束後進行排水並割除地上部枝葉 (箭號) 使分蘗同期長出，而第二筍期採收後並同時施以夜間照光 60 d (灰色橫虛線)。

**Fig. 3.** Effect of shoots cut-off and night-time lighting on the yield of water bamboo. Arrows indicate the date of cutting shoots off and gray horizontal dashed lines show the treatment of night lighting for 60 d.

給予處理 75 d，在停止夜間照光後約 29 d (1 月 27 日) 開始採筍，採收 23 d 結束 (2 月 19 日)，產量為 16.7 t $ha^{-1}$ (圖 4C)。而處理 D 組則夜間照光日數為 90 d，在停止夜間照光後約 36 d (翌年 2 月 18 日) 開始採筍，採收 26 d 結束 (3 月 16 日)，產量為 21.9 t $ha^{-1}$ (圖 4D)。

## 建立茭白筍週年採收栽培流程

產期調控第一區自割除枝葉長新苗後約 90 d 開始產筍，但筍季集中，且有 3 個筍期，分別於 4 月上旬至 5 月上旬、8 月上旬至 9 月上旬與 12 月整月，產量分別為 14.8、15.4 及 11.4 t $ha^{-1}$，全年產量為 41.6 t $ha^{-1}$ (圖 5A)。產期調控第二區，自割除枝葉長新苗後約 95 d 開始產筍，亦有 3 個集中筍期，分別於 3 月中旬至 4 月中旬、7 月中旬至 8 月中旬與 11 月中旬至 12 月上旬，產量分別為 14.2、9.2 及 13.8 t $ha^{-1}$，全年產量為 37.1 t $ha^{-1}$ (圖 5B)。產期調控第三區，自割除枝葉長新苗後約 90 d 開始產筍，3 個集中筍期，分別於 1 月下旬至 2 月下旬、6 月整月與 9 月下旬至 12 月下旬，產量分別為 14.6、10.3 及 13.3 t $ha^{-1}$，全年產量為 38.2 t $ha^{-1}$ (圖 5C)。在慣行農法區種植後約 90 d 開始少量產筍，3 月下旬至 6 月下旬採收第一期筍，產量為 14.2 t $ha^{-1}$，7 月中旬至 10 月中旬採收第二期筍，產量為 20.5 t $ha^{-1}$，全年產量為 34.7 t $ha^{-1}$ (圖 5D)。

## 討論

本研究結果顯示，在南投縣栽培的茭白「早生青殼」品種，提早種植易發生矮化症，此係由於茭白幼苗對短日照敏感，植株尚未成長即結筍所致。故以人工光源於茭白生長初期進行夜間照光 60 d，則可避免矮化症的發生，在停止夜間照光 30 d 後 (苗齡 90–100 d) 結筍，採收期可落在 3 月而較慣行農法提早約 20 d。再利用採筍期末期排水並割除枝葉，短期間內大量長出茭白幼苗，使第二期作茭白筍結筍期集中，以縮短採筍期而增加茭白生長時間，便可在冬季配合夜間照光創造出第 3 個筍期。於數塊田

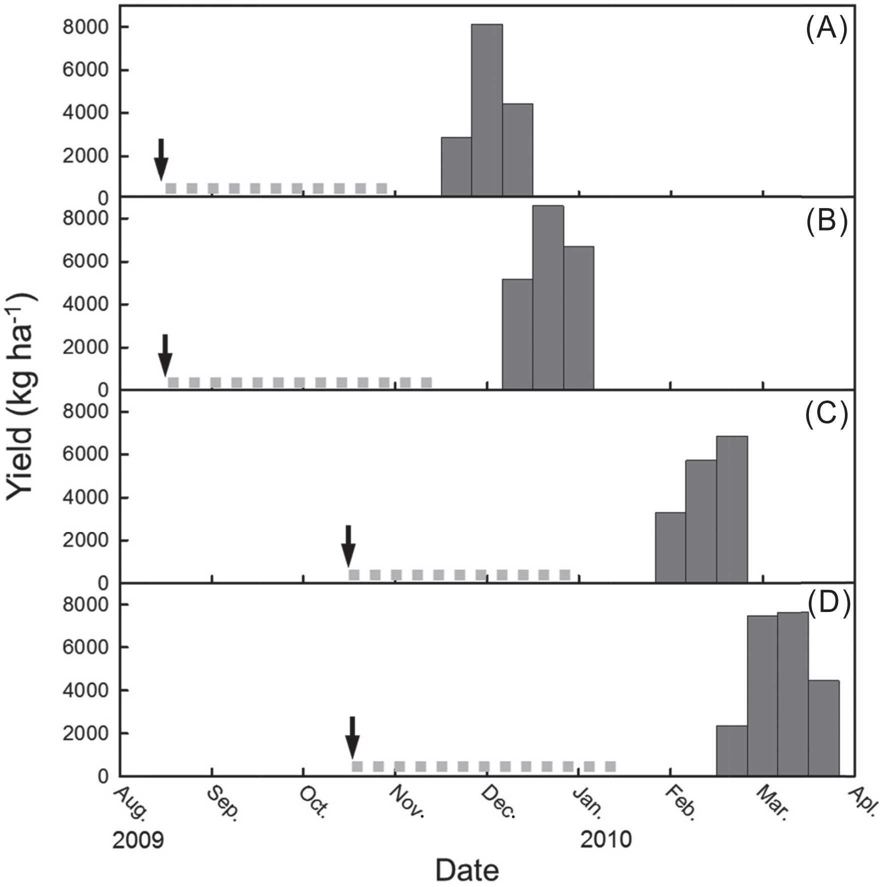



**圖 4.**　夜間照光日數對茭白筍的採收期與產量之影響。(A) 及 (C) 為夜間照光 75 d 處理，(B) 及 (D) 為 90 d 處理。(A)、(B)、(C) 及 (D) 為 4 個試驗田編號。 箭號所指為割除茭白地上部全部枝葉時間，灰色橫虛線則為夜間照光期間。

**Fig. 4.**　Effect of night-lighting days on the yield of water bamboo. The periods of night lighting were 75 d in treatments (A) and (C). There were 90 d in treatments (B) and (D). (A), (B), (C) and (D) represented 4 individual fields. Arrow indicated the date of cutting shoots and gray dashes represented the duration of night-lighting.

區分別於不同月份進行排水並割除枝葉，在長夜季節配合夜間照光，則可將茭白結筍期錯開，得以調控茭白筍產季而週年採收。

生長箱的栽培試驗結果顯示，茭白幼苗於長夜處理有高結筍率，而於中短夜處理則不結筍，但株齡約 3 個月的成株即使於 16 h $d^{-1}$ 長日處理仍有 50.0% 結筍率 (表 1)。顯示茭白植株對光的感受性因株齡不同，幼苗較成株敏感。幼苗矮化症不曾在夏季出現 (Huang & Ann 2016)，而夏季成株結筍率會較其他季節低 (圖 2、3、5)，可能與日照較長且溫度較高有關。然而在延長夜間光照日數的田間試驗，茭白植株於株齡 110–120 d 結筍 (圖 4B、4D)，較慣行栽培 90–100 d 結筍延後約 20 d 結筍，而部分夜間照光度強的區域，茭白筍結筍的株齡更延後，可見株齡 90–100 d 茭白植株並不一定會結筍，視茭白品種、茭白黑穗菌與環境之間的相互作用而定。

田間試驗的結果顯示，夜間照光會抑制茭白結筍，然而停止夜間照光並不會開始結筍。停止夜間照光後，夜長較長的月份較快結筍，而夜長次長的月份則較慢結筍，在 11–12 月停止夜間照光 2–3 wk 後即開始結筍，而在 1–3 月須停止夜間照光 4–6 wk (圖 2–5)。此現象可能

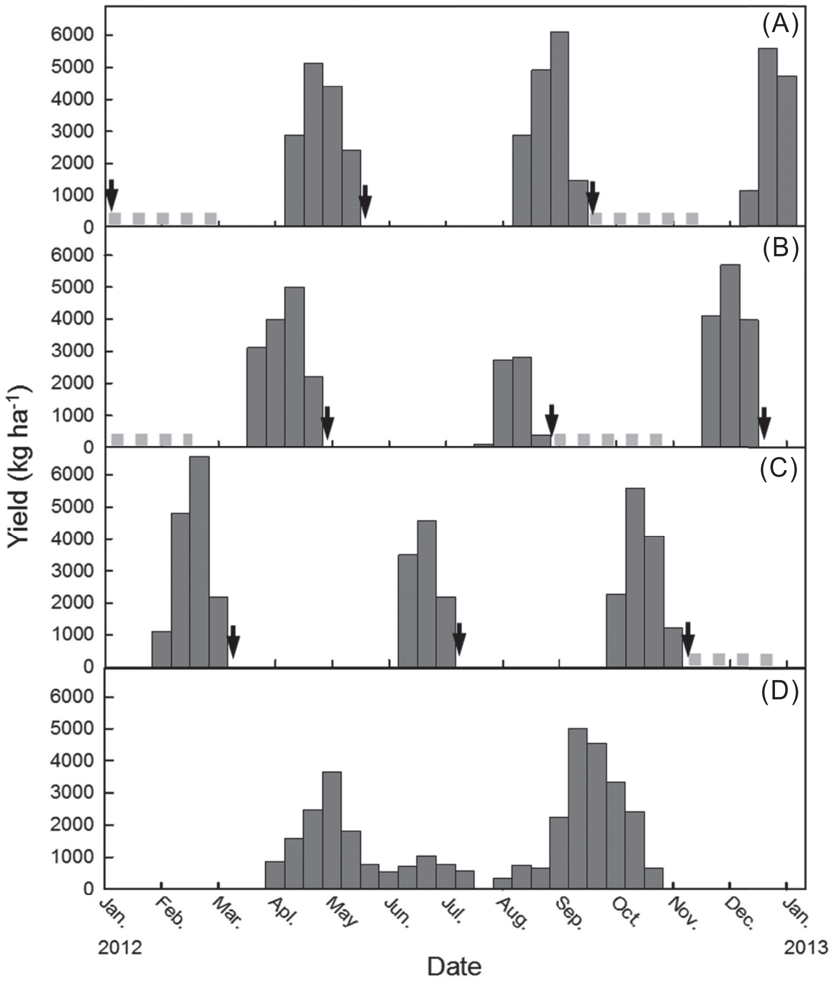



**圖 5.** 茭白筍週年採收栽培流程之建立。(A)、(B) 及 (C) 為 3 個不同割除茭白地上部全部枝葉與夜間照光規劃試驗，(D) 為慣行栽培期。箭號所指為割除茭白地上部全部枝葉時間，灰色橫虛線則為夜間照光期間。

**Fig. 5.** The establishment of year-round production in water bamboo. (A), (B) and (C) represented three treatments with different shoot cutting and night lighting schedule; (D) was ordinary cultivation. Arrows indicate the date of cutting shoots and gray dashes represented the duration of night-lighting.

與光照與溫度有關，值得進一步探討。由於夜間照光會抑制結筍，故夜間照光的日數長的處理較日數短的處理延後結筍，但生長期長的茭白筍產量較生長期短的處理高，原因是生長期較長的茭白植株較為高大，莖部也較粗大，故所結之筍形體也較大，所以產量較高 (圖 4)。

在慣行的栽培方法中，最初是由 1 或 2 個種莖長出數枝幼苗，再逐次長出更多的分櫱苗而成叢，而成株亦逐次結筍，使每一個採筍期約在 2–2.5 個月。故在南投的「早生青殼」茭白品種 1 年二收，顯示出雙季茭的特性。然而本研究發現，在第一與第二筍期末期排水並割除枝葉，讓茭白叢基盤在短期間內大量長出茭白幼苗，使結筍期變得較集中而 1 個筍期可縮短成 1 個月，並且有足夠的時間於冬季配合夜間照光創造出第三個筍期。本研究亦証明可週年產筍，明顯與以往雙季茭的定義不同。

茭白筍是茭白植株受茭白黑穗菌感染，在

適當的環境條件下，於莖部所形成的菌癭，故應將茭白結筍視為“發病”，而病害與寄主、病原菌以及環境之間的相互作用有關。中國學者將茭白品種主要區分為對日照敏感的單季茭和對日照不敏感的雙季茭，而雙季茭又進一步分為夏茭為主型 (高溫孕茭型) 與夏秋兼用型 (低溫孕茭型 ) (Zhao *et al*. 1989; Jiang 2004)，亦說明茭白結筍是與環境息息相關。本研究可將原歸類為雙季茭的「早生青殼」茭白品種，調控為一年可三收的“三季茭”，甚至可調控產筍的月份。故以產筍期的數目與時期來區分白筍的品種，筍的品種是否適合，則有待進一步研究與釐訂。

## 引用文獻


Chan, Y. S. and L. B. Thrower. 1980. The host-parasite relationship between *Zizania caduciflora Turcz*. and *Ustilago esculenta* P. Henn. New Phytol. 85:201–233.

Guo, H. B., S. M. Li, J. Peng, and W. D. Ke. 2007. *Zizania latifolia* Turcz. Cultivated in China. Genet. Resour. Crop Evol. 54:1211–1217.

Huang, J. H. and P. J. Ann. 2016. Occurrence and control of stunting disease of water bamboo. J. Taiwan Agric. Res. 65:278–285.

Huang, J. H., P. J. Ann, and Y. S. Lin. 2009. Stunting disease, harvesting period regulation and basal stem rot control of water shoots. Plant Pathol. Bull. 18:70–71. (in Chinese with English abstract)

Jiang, J. Z. 2004. Variations among cultivars of *Zizania latifolia* in nutrients accumulation and distribution and the mechanisms. Ph.D. Dissertation, Yangzhou University, Jiangsu, China. 116 pp.

Leu, L. S., H. C. Yang, and S. K. Sun. 1977. Preservation of wateroat, a crown gall of *Zizania latifolia* induced by *Ustilago esculenta*. Plant Prot. Bull.19:238–244.

Lin, T. C. 1995. Present status on Co-ba (*Zizania latifolia* Turcz.) production. p.215–226. *in*: Proceeding of Symposium on Improvement of Vegetable Industry in Taiwan. December 1, 1995. Taichung Dist. Agric. Res. and Exten. Stat. Publ., Taichung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Lin, T. C. 2005. Water bamboo. p.271–276. *in*: Taiwan Agriculture Encyclopedia (Crop edition). 3rd ed. Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei, Taiwan. 4700 pp. (in Chinese)

Terrell, E. E. and L. R. Batra. 1982. *Zizania latifolia* and *Ustilago esculenta*, a grass-fungus association. Econ. Bot. 36:274–285.

Thrower, L. B. and Y. S. Chan. 1980. Gan Sun: A cultivated host-parasite combination from China. Econ. Bot. 34:20–26.

Yang, H. C. and L. S. Leu. 1978. Formation and histopathology of galls induced by *Ustilago esculenta* in *Zizania latifolia*. Phytopathol. 68:1572–1576.

Zhao Y. W., P. S. Cao, and L. B. Xue. 1989. A preliminary study on classification of main variety resource of aquatic vegetables in China. J. Jiangsu Agri. Coll. 10:15–20.

# Regulating the Harvest Period of Water Bamboo by Use of Night-time Lighting and Shoots Cut-off

Jin-Hsing Huang[1,*], Jiunn-Feng Su[2], and Po-Sung Chen[3]

## Abstract

Huang, J. H., Su, J. F., and Chen P. S. 2018. Regulating the harvest period of water bamboo by use of night-time lighting and shoots cut-off. J. Taiwan Agric. Res. 67(3):309–317.

'Green Shell Early' water bamboo is conventionally cultivated from January to October annually in Taiwan. The edible galls could be harvested in April–June and July–October, designed as the first and the second harvest periods, respectively. Earlier planting could result in a physical disorder named as "stunting disease." Based on the experiment conducted inside growth chambers, short daylength favors gall formation in regardless of shoot age, and the sensitivity to short daylength of gall formation was stronger in younger plants. It indicated that "stunting disease" may resulted from the early formation of gall in plants when they are too young under short daylength. Thus the stunting disease could avoided by night lighting at young plant age when planted early. By this way young plants were planted 30 d earlier than normal and supplied with 60 d night lighting (12 h $d^{-1}$). Normal edible galls could be harvested about 20 d earlier than the conventional cultivation. Cutting off all the shoots after the second harvest may result in synchronically shoot regeneration. Therefore, a third harvest period could be created in winter by the combination treatment of shoot cut off and night lighting after the second harvest. The harvest time could be advanced or delayed by decreasing or increasing the duration of night lighting. Thus, the harvest period could be scheduled more accurately. A year-round production system could be achieved by applying the three-harvest-period cultivation technique in different subsections in the field conditions.

**Key words:** Water bamboo, Harvest period regulation, Year round harvest.

Received: July 19, 2016; Accepted: December 8, 2017.
* Corresponding author, e-mail: jhhuang@ tari.gov.tw
1 Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(3):318–322 (2018)
DOI:10.6156/JTAR.201809_67(3).0009

研究簡報

# 靈芝引起的檳榔基腐病

蔡志濃[1]　安寶貞[2,*]　林筑蘋[3]　蔡惠玲[4]

## 摘要

蔡志濃、安寶貞、林筑蘋、蔡惠玲。2018。靈芝引起的檳榔基腐病。台灣農業研究 67(3):318–322。

自 2006–2012 年由台灣 7 處果園 (包括高雄市、屏東內埔與萬巒，及南投草屯) 分離為害檳榔的靈芝病原菌，共獲得 32 菌株。在田間，靈芝為害檳榔的根系與莖基部，造成根部與莖基部組織褐變腐敗，終至樹木死亡。罹病的檳榔樹基部與根系，則長出子實體-擔子果 (basidiocarp)。擔子果具短柄或無，正面菌蓋 (pileus) 褐色、紅褐色或暗褐色，具假漆狀光澤；背面菌孔面 (pore surface) 淡黃色或淡灰黃色，菌孔圓形或橢圓形。利用太空包木屑培養 (plastic bag sawdust culture)，也可以誘導靈芝菌形成擔子果，釋放擔孢子，惟形成的擔子果較田間自然生長者較小。以小麥-燕麥培養基培養靈芝菌種，接種後可以誘發接種之檳榔組織褐變，並可再分離到原接種靈芝菌，完成病原性測定。參考前人文獻，比較檳榔靈芝菌之子實體、菌孔及擔孢子的形態與大小，以及上網 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 資訊庫比對 ITS DNA (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) 序列，證實為害台灣檳榔的靈芝菌為狹長孢靈芝 (*Ganoderma boninense*)。

**關鍵詞**：檳榔、狹長孢靈芝、*Ganoderma boninense*。

檳榔 (betel palm)，學名 *Areca catechu*，屬棕櫚科多年生常綠喬木，原產馬來西亞一帶 (Wikipedia 2018)。依據行政院農業委員會農糧署近年記載，我國目前之檳榔栽培面積約 5 萬公頃，主要分布在屏東、南投、嘉義、花蓮及台東等地 (http://www.afa.gov.tw/)。在檳榔園內偶而會見到植株枯萎與死亡情形，降雨後亦可見靈芝之子實體-擔子果 (basidiocarp) 自樹幹基部長出 (圖 1)；將罹病樹幹基部切開，可見內部組織褐色腐敗，發病組織與健康組織間之區別不明顯，嚴重時全株死亡，死亡植株的樹幹基部仍會繼續長出靈芝擔子果。田間觀察到的靈芝擔子果具短柄或無，菌蓋 (pileus) 正面褐色、紅褐色或暗褐色，具假漆狀光澤，背面菌孔面 (pore surface) 淡黃色或淡灰黃色。菌蓋大小 8.5–18.0 cm × 6.6–10.5 cm × 2.0–5.0 cm，平均值 12.7 cm × 8.5 cm × 3.5 cm (圖 2)。

**圖 1.**　*Ganoderma boninense* 在田間為害檳榔樹根部與莖基部，產生子實體之情形。

**Fig. 1.**　Young basidiocarps of *Ganoderma boninense* produced on the root and basal stem of an infected betel palm tree.

投稿日期：2017 年 12 月 29 日；接受日期：2018 年 2 月 24 日。
* 通訊作者：pjann@tari.gov.tw, pjann5039@gmail.com
[1] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組前研究員兼組長。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

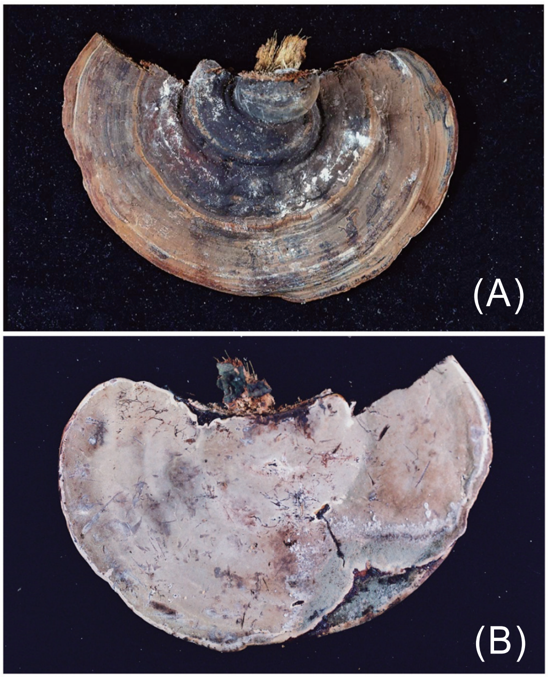



**圖 2.** 田間採集之 *Ganoderma boninense* 成熟子實體的背面 (A) 與腹面 (B)。

**Fig. 2.** A mature basidiocarp of *Ganoderma boninense* collected from a diseased betel palm tree in the field showing upper side pileus (A) and lower side pore surface (B).

採集檳榔罹病組織與靈芝擔子果，採集地點分別包括高雄市 (2006 年)、屏東內埔 (2007、2011、2012 年) 與萬巒 (2010 年)、及南投草屯 (2012 年) 等 7 處檳榔園。將罹病組織及靈芝擔子果菌體切成 0.5 cm × 0.5 cm 大小，經次氯酸鈉水溶液 (0.5% NaClO) 滅菌 1 min 後，將罹病組織與擔子果菌體移置於人工製作之馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA) 平板培養基上，放置於室溫 24–28℃下培養，分離病原菌。經 2–3 d 後，具有扣子體 (clamp connection) 及鹿角菌絲 (trichocysts) 的菌體自分離組織之邊緣長出，經單菌絲分離後，共獲得 32 菌株 (包括分離自罹病菌株組織 18 菌株與擔子果菌株 14 菌株)。分離自罹病組織與擔子果之菌株，在 PDA 培養基上的培養形態特徵完全相同，菌落初期為白色，菌落背面為淡黃色，逐漸轉為褐色至暗褐色，培養基嚴重龜裂 (圖 3)。在 PDA 上之菌絲平滑，具扣子體，菌落表面長有大量的鹿

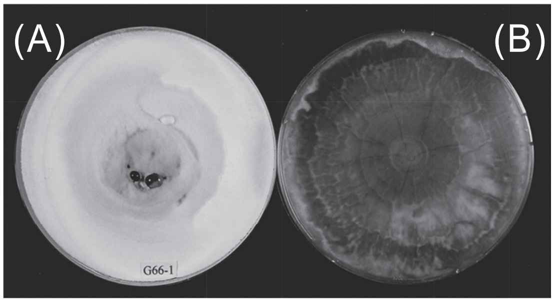



**圖 3.** *Ganoderma boninense* isolate R206008 於 24℃在馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA) 培養基上生長 30 d 的菌落形態。正面 (A) 與背面 (B)。

**Fig. 3.** Characteristics of colony morphology of a *Ganoderma boninense* isolate R206008 grown on potato dextrose agar (PDA) at 24℃ for 30 d showing upper surface (A) and under surface (B).

角菌絲；菌絲直徑平均 2.25–(2.73)–3.75 μm；該菌不具有厚膜孢子。利用太空包木屑培養 (plastic bag sawdust culture) 來促進供試檳榔靈芝菌株形成擔子果，太空包 (24 cm × 18 cm × 5 cm) 由農委會農業試驗所植物病理組菇類研究室提供，每包太空包約含 500 g 介質，其配方 (體積比) 為，粗木屑 (saw dust)：細木屑：米糠 (rice bran)：0.25% $CaCO_3$ = 6：3：1.5：0.1，攪拌均勻後，再加水攪拌使含水量約為 65%。供試菌株，則包括 R206008 與 R210222 (分別分離自高雄檳榔罹病組織與屏東萬巒檳榔靈芝子實體)。靈芝菌先在 PDA 上於 24℃無光照培養 5 d，每個太空包接種 5 塊菌塊 (7.5 mm × 7.5 mm × 3.0 mm)，置於 24℃下無光照培養，等菌絲長滿整個太空包時 (約需 1–1.5 mo)，除去頂端塑膠袋外膜，放置於溫室 (28–32℃) 消毒過河沙或土壤上，並以泥炭苔 (peat moss) 保濕。約 1–2 wk 後太空包內的靈芝菌開始出菇，長出擔子果，約 2–3 wk 後擔子果成熟並開始釋放擔孢子 (basidiospore)。擔子果較田間觀察者較小，大小 7.0–(8.3)–10.0 cm × 5.5–(6.7)–7.5 cm × 1.2–(1.5)–2.5 cm；具短柄或無，菌蓋褐色至紅褐色，具假漆狀光澤。腹面菌孔面淡黃或淡灰色，具圓形或近圓形菌孔 (pore)，孔徑大小 180–(211.5)–250 μm × 130–(155.5)–180 μm (圖 4A)，內長有擔子 (basidium)，每擔子上長有 4 個擔孢子。擔孢子黃褐色，狹長擬紡錘型 (fusoid)，大小 11–(11.58)–12 μm

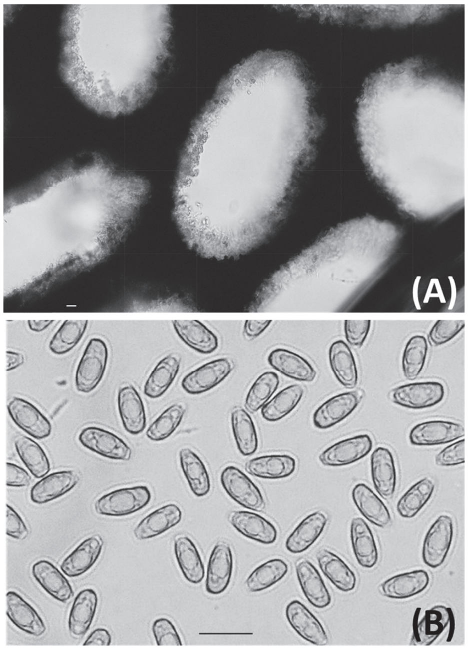



**圖 4.**　人工培養 *Ganoderma boninense* 菌株 R206008 於太空包上形成子實體，產生菌孔 (A) 與擔孢子 (B) 之情形。Bar = 10 µm。

**Fig. 4.**　Artificial production of basidiocarps of a *Ganoderma boninense* isolate R206008 on sawdust medium. Formation of pores (A) and basidiospores (B). Bar = 10 µm.

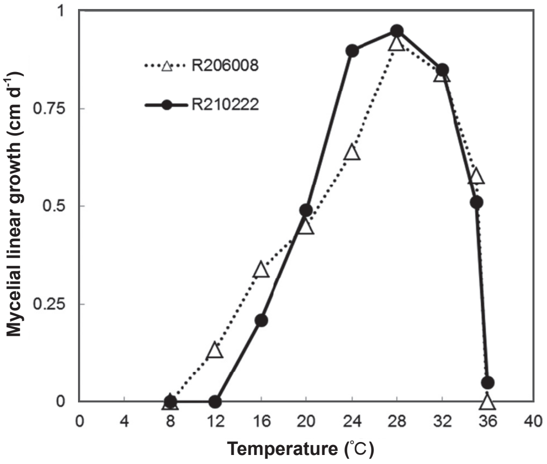



**圖 5.**　*Ganoderma boninense* 菌絲在馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA) 培養基於不同溫度下之直線生長情形。

**Fig. 5.**　Effect of temperatures on mycelial linear growth of *Ganoderma boninense* on potato dextrose agar (PDA).

× 4–(4.78)–6 µm，孢子長寬比平均 (L/W) 2.0–(2.46)–2.9 (圖 4B)。測量溫度對檳榔靈芝之菌絲生長之影響，將供試菌株 R206008 與 R210222 於 24℃培養在 PDA 上 5 d，然後將菌絲塊 (7.5 mm × 7.5 mm × 3.0 mm) 移植於 PDA (直徑 9 cm) 的邊緣，放置於 8、12、16、20、24、28、32、35 及 36℃，每處理 2 重複，結果顯示檳榔靈芝菌之菌絲生長溫度範圍為 12–36℃，最適合生長溫度為 24–28℃ (圖 5)。對照 Steyaert (1975) 與 Ho & Nawawi (1985) 發表的報告，從台灣檳榔上分離的菌株，無論菌蓋、菌孔、或擔孢子方面，其形態、色澤及大小部分均十分相符。尤其擔孢子非常狹長，長寬比平均達 2.46，因此菌種的形態鑑定為 *Ganoderma boninense* Pat.，中文名“狹長孢靈芝”。

在病原性測定方面，利用 Ko & Kunimoto (1986) 開發的小麥-燕麥培養基 (wheat-oat medium) 來培養靈芝病菌，將供試靈芝菌菌株 R206008 與 R210222 於 24℃下培養 1–3 mo 後為接種源，供接種檳榔幼苗 (1 年生以下)。接種時，參考 Ann & Ko (1988) 開發的方法，將幼苗葉柄基部經酒精 (70% alcohol) 消毒後，用解剖刀輕輕刮去表面組織，將約 1–2 g 的接種源覆蓋於傷口上，並用透氣帶 (Micropore™, 3M Company, MN, USA) 固定，再以鋁箔紙包覆，置於溫室陰涼處 (24–28℃)，每菌株接種 5 株。1 mo 後檢視傷口，結果顯示有 30% 接種傷口褐變，直徑約 2–3 cm，罹病組織可以分離到原接種病原菌，而沒有傷口接種的對照處理則沒有發病。

在分子鑑定方面，進行 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (簡稱 ITS) 核酸序列定序與分析比對。將檳榔靈芝菌分離得到的菌株 7 株 (含 R206008 與 R211005 菌株)，培養於上覆玻璃紙 (cellophane) 的 PDA 培養基上，於 24℃下培養 7 d 後，收取菌絲。經冷凍乾燥後，抽取 DNA，再利用 its5 與 its4 引子對 (White *et al*. 1990) 以聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction; PCR) 進行增幅 ITS rDNA 及其序列直接定序，此部分委託昕穎生物科技公司 (Seeing Bioscience Company, Taipei, Taiwan) 進行。結果定序出一長度 597 bp 的核酸序列，所有 7 株靈芝菌的相同度 (identity) 為 99.16–100%。此外，將 R206008 與

R211005 菌株的核酸序列上傳到 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站，利用 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 搜尋軟體與 GenBank 資訊庫收錄的核酸序列進行比對，最相近的菌種 (species) 與菌株為 *Ganoderma boninense* isolate GB001，與其 ITS 核酸序列 (Accession number KX092000.1) 相同度達 99.5%，僅有 3 個鹽基相異。此外，並將菌株 R206008 與 R211005 的基因序列的資訊登錄於 GenBank 資料庫中，Accession number 分別為 MG200172 與 MG200173。

*Ganoderma boninense* 是東南亞國家油棕 (oil palm) 的重要病原菌 (Lim *et al*. 1992)，造成很大的經濟損失。本試驗經由靈芝的形態特徵，比較 Steyaert (1975) 及 Ho & Nawawi (1985) 等所描述狹長孢靈芝之形態特徵與 ITS 核酸序列比對，證實為害台灣檳榔的靈芝病害亦由該菌 (狹長孢靈芝) 引起。

## 誌謝

本文承蒙柯文雄教授修正英文，謹此誌謝。

## 引用文獻

Ann, P. J. and W. H. Ko. 1988. Root rot of macadamia caused by *Ganoderma lucidum* and *Kretzchmaria clavus* in Taiwan. J. Agric. Res. China. 37:424–429.

Ho, Y. W. and A, Nawawi. 1985. *Ganoderma boninense* Pat. from basal stem rot of oil palm (*Elaeis guineensis*) in Peninsular Malaysia. Pertanika 8:425–428.

Ko, W. H. and R. K, Kunimoto. 1986. A rapid method for screening macadamia seedlings for resistance to *Kretzschmaria clavus*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 52:336–337.

Lim, T. K., G. F. Chung, and Ko, W. H. 1992. Basal stem rot of oil palm caused by *Ganoderma boninense*. Plant Pathol. Bull. 1:147–152.

Steyaert, R. L. 1975. *Ganoderma boninense*. CMI Descr. Pathog. Fungi Bact. 45:444.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics. p.315–322. *in*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M.A., D. H. Gelfand, J. J. Snirsky, and T. J. White, eds.) Academic Press. San Diego, CA. 482 pp.

Wikipedia. 2018. *Areca catechu*. https://en.wikipedia.org/wiki/Areca_catechu (visit on 2/24/2018)

# Basal Stem Rot of Betel Palm Caused by *Ganoderma boninense* in Taiwan

Jyh-Nong Tsai[1], Pao-Jen Ann[2,*], Chu-Ping Lin[3], and Hui-Ling Tsai[4]

## Abstract

Tsai J. N., P. J. Ann, C. P. Lin, and H. L. Tsai. 2018. Basal stem rot of betel palm caused by *Ganoderma boninense* in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 67(3):318–322.

From 2006 to 2012, a total of 32 isolates of *Ganoderma* sp. were isolated from betel palm in seven orchards located at Kaohsiung City, Neipu and Wanluan of Pingtung County, and Caotun of Nantou County in Taiwan. In the field, *Ganoderma* could infect root and stem base of betel palm, causing root and stem base brown rot and necrosis, and eventual death. Basidiocarps emerging from stem base of the diseased betel palm were stipitate, or sessile. Upper surface of pileus was brown to dark, red-brown, and laccate. Pore surface was pale yellow to grey and pores were circular to oval. Basidiocarps could be produced when cultured on sawdust medium, but were smaller in size than those grown in the field. Inoculation of purified *Ganoderma* isolates on betel palm showed brown rot symptom, and the same *Ganoderma* was reisolated, confirming the pathogenicity. Based on morphological characteristics, including fruiting body, pore surface and basidiospores, and result of ITS region (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) sequence similarity searching, done via Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) provided from National Center for Biotechnology Information (NCBI), *Ganoderma* infecting betel palm in Taiwan was identified as *Ganoderma boninense*.

**Key words:** Betel palm, *Ganoderma boninense*.

Received: December 29, 2017; Accepted: February 24, 2018.
* Corresponding author, e-mail: pjann@tari.gov.tw, pjann5039@gmail.com
1 Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Former Research Fellow and Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
4 Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

# Editorial Board

## Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
*Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute*

## Editors

Ann, Pao-Jen
*Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute*
Chang, Ruey-Jang
*Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute*
Chang, Yung-Ho
*Department of Food and Nutrition, Providence University*
Chen, Chien-Chung
*Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute*
Chen, Chiling
*Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute*
Chen, Chung-Li
*Department of Agronomy, National Chung Hsing University*
Chen, Iou-Zen
*Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University*
Chen, Suming
*Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University*
Chen, Yu-Hui
*Department of Agricultural Economics, National Taiwan University*
Chien, Li-Hsien
*Department of Applied Economics, National Chung Hsing University*
Chung, Wen-Hsin
*Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University*
Do, Yi-Yin
*Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University*
Hou, Feng-Nan
*Department of Entomology, National Chung Hsing University*
Huang, Chao-Chia
*Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute*
Huang, Jenn-Wen
*Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University*
Huang, Pung-Ling
*Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University*
Huang, Yuh-Ming
*Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University*
Juang, Kai-Wei
*Department of Agronomy, National Chiayi University*
Kao, Ching-Huei
*Department of Agronomy, National Taiwan University*
Ko, Chiun-Cheng
*Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University*
Ku, Hsin-Mei
*Department of Agronomy, National Chung Hsing University*
Kuo, Bau-Jeng
*Department of Agronomy, National Chung Hsing University*
Lin, Huey-Ling
*Department of Horticulture, National Chung Hsing University*
Lin, Yann-Rong
*Department of Agronomy, National Taiwan University*
Liu, Li-Yu
*Department of Agronomy, National Taiwan University*
Lu, Hsiu-Ying
*Miaoli District Agricultural Research and Extension Station*
Lu, Kuang-Hui
*Department of Entomology, National Chung Hsing University*
Shen, Wei-Chiang
*Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University*
Tsay, Jyh-Rong
*Taiwan Agricultural Research Institute*
Tseng, Menq-Jiau
*Department of Horticulture, National Chung Hsing University*
Tzou, Yu-Min
*Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University*
Wang, Chan-Sen
*Department of Agronomy, National Chung Hsing University*
Wang, Shu-Jen
*Department of Agronomy, National Taiwan University*
Wu, Wen-Jer
*Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University*
Yang, Jeng-Tze
*Department of Entomology, National Chung Hsing University*
Yen, Gow-Chin
*Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University*

## Editorial Assistants

Wang, Li-Jung
*Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research*
Wang, Zi-Yu
*Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research*
Wu, Huei-Ching
*Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute*

## Consultant to Editorial Office

Wu, Yi-Yan
*Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute*



JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 67 No. 3 September 30, 2018

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

| | |
|---|---|
| Publisher | Junne-Jih Chen |
| Editor-in-Chief | Chwen-Ming Yang |
| Address | No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC |
| Website | http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236 |
| Submission | http://www.ipress.tw/J0042 |
| Press | Airiti Press |
| Address | 18F, No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC |
| Tel | +886-2-2926-6006 |
| E-mail | press@airiti.com |
| Price | NT$ 175 (per copy) |
| Distributor | 1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC<br>GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207<br>2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC<br>Tel: +886-4-2226-0330 |